

FACULTE DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1934

THÈSE

N° 752

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Gustave ROUËSSÉ

Né le 25 janvier 1907 à Cholet (M.-et-L.)

ÉTUDE COMPARATIVE
DU SÉRUM COAGULÉ

ET DES

MILIEUX DE CLAUBERG ET D'ANDERSON

(DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE LA DIPHTÉRIE)

Remarque sur la valeur de la dissociation
du bacille diphtérique en trois types et sur la valeur
du test à l'amidon

(Travail du Laboratoire de la Diphtérie, Institut Pasteur)

Président : M. NOBÉCOURT, Professeur

PARIS

LIBRAIRIE LOUIS ARNETTE

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNÉ 2,

1934

ANNÉE 1934

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Gustave ROUËSSÉ

Né le 23 janvier 1907 à Cholet (M.-et-L.)

ÉTUDE COMPARATIVE
DU SÉRUM COAGULÉ
ET DES

MILIEUX DE CLAUBERG ET D'ANDERSON
(DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE LA DIPHTÉRIE)

Remarque sur la valeur de la dissociation
du bacille diphtérique en trois types et sur la valeur
du test à l'amidon

(Travail du Laboratoire de la Diphtérie, Institut Pasteur)

Président : M. NOBÉCOURT, Professeur

PARIS

LIBRAIRIE LOUIS ARNETTE

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE 2,

1934

I. — PROFESSEURS

MM.

Anatomie	ROUVIERE.
Physiologie	Leon BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	DESGREZ.
Bactériologie	Robert DEBRÉ.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie médicale et générale	BAUDOUIN.
Pathologie chirurgicale	CHEVASSU.
Anatomie pathologique	ROUSSY.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	LOEPER.
Hygiène et Médecine préventive	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LAIGNEL-LAVASTINE.
Pathologie expérimentale et comparée	FIESSINGER.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	Maurice VILLARET.
Clinique médicale	BEZANÇON.
	CARNOT.
	CLERC.
	Marcel LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance	LEREBOULLET.
Clinique des maladies des enfants	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	LEMIERRE.
	CUNÉO.
Clinique chirurgicale	GOSSET.
	GRÉGOIRE.
	LENORMANT.
Clinique ophtalmologique	TERRIEN.
Clinique urologique	MARION.
	BRINDEAU.
Clinique d'accouchements	COUVELAIRE.
	JÉANNIN.
Clinique gynécologique	PROUST.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	OMBRÉDANNE.
Clinique thérapeutique médicale	RATHERY.
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique	SERGENT.
Clinique de la tuberculose	N...
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte	MATHIEU.
	HOVELACQUE.
Professeurs sans chaire	MULON.
	OLIVIER.
	VERNE.

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.

BÉNARD (Henri) . .	Pathologie médicale.
BOULIN . . .	Pathologie médicale.
BULLIARD . . .	Histologie.
CATHALA . . .	Pathologie médicale.
CHEVALLIER . .	Pathologie médicale.
DOGNON. . .	Physique.
FEY	Urologie.
GALLIARD . . .	Parasitologie.
GASTINEL . . .	Bactériologie.
de GAUDART D'ALLAINES	Pathologie chirurgicale.
GAYET	Physiologie.
GIROUD	Histologie.
HAGUENAU . . .	Pathologie médicale.
HALPHEN . . .	Oto-rhino laryngologie.
HAZARD. . . .	Pharmacologie.
HUGUENIN . . .	Anatomie pathologique.
JOANNON	Hygiène.
LABBÉ (Henri). .	Chimie biologique.
LACOMME	Obstétrique.
LANTUÉJOUL . .	Obstétrique.
LAROCHE (Guy) .	Pathologie médicale.

MM.

LEMAIRE	Pathologie expérimentale.
LEVEUF	Pathologie chirurgicale.
Mlle J. LÉVY . . .	Pharmacologie.
LÉVY-VALENSY. .	Neurologie et Psychiatrie.
MOREAU	Pathologie médicale.
MOULONGUET . .	Pathologie chirurgicale.
MOUQUIN	Pathologie médicale.
OBERLING	Anatomie pathologique.
PETIT-DUTAILLIS .	Pathologie chirurgicale.
PIEDELIEVRE. . .	Médecine légale.
PORTES	Obstétrique.
RICHET	Physiologie.
SANNIÉ	Chimie biologique.
SÈNEQUE	Pathologie chirurgicale.
TROISIER	Pathologie expérimentale.
TURPIN	Pathologie médicale.
VIGNES	Obstétrique.
WILMOTH	Pathologie chirurgicale.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

pour le service des examens

MM.

ALGLAVE	Pathologie chirurgicale.
BUSQUET	Pharmacologie.
CHAILEY-BERT . .	Physiologie.

MM.

LEROUX	Anatomie pathologique.
NEVEU-LEMAIRE. .	Parasitologie.
ZIMMERN	Physique.

IV — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE

à titre permanent

MM.		MM.	
ALAJOUANINE.	Clinique médicale.	BROcq . . .	Clinique chirurgicale
ABRAMI . . .	Clinique médicale.	CADENAT . . .	Clinique chirurgicale
AUBERTIN . . .	Clinique médicale.	GATELLIER. . .	Clinique chirurgicale
BRULE. . . .	Clinique médicale.	HEITZ-BOYER .	Clinique chirurgicale
CHABROL . . .	Clinique médicale.	MOCQUOT . . .	Clinique chirurgicale
CHIRAY . . .	Clinique médicale.	MOURE	Clinique chirurgicale
DONZELOT . . .	Clinique médicale.	QUENU	Clinique chirurgicale
DUVOIR	Clinique médicale.	SCHWARTZ. . .	Clinique chirurgicale
HARVIER. . . .	Clinique médicale.	VELTER	Clinique chirurgicale
LIAN	Clinique médicale.	ECALLE	Clinique obstétricale
SÉZARY	Clinique médicale.	GUÉNIOT. . . .	Clinique obstétricale
VALLERY — RA-		LE LORIER . . .	Clinique obstétricale
DOT (Pasteur)	Clinique médicale.	LÉVY-SOLAL . .	Clinique obstétricale
BASSET	Clinique chirurgicale.	METZGER . . .	Clinique obstétricale

V. — CHARGÉS DE COURS

CHAILLEY-BERT, agrégé . .	Éducation physique.
LEDOUX-LÉBARD.	Radiologie clinique.
WEIL-HALLÉ	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émis dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

AUX MIENS

A MON AMI JACQUES S. BOURDIN

Externe des Hôpitaux

A MES CAMARADES DE L'HOPITAL D'ANGERS
ET DE L'INSTITUT PASTEUR

A MES AMIS

Au Docteur ROUX (*in memoriam*)

Au Docteur Louis MARTIN

Directeur de l'Institut Pasteur
Membre de l'Académie de Médecine
Président du Conseil Supérieur d'Hygiène

A Monsieur le Professeur NOBÉCOURT

Professeur de la clinique médicale des Enfants-Malades
Membre de l'Académie de Médecine

*Nous le remercions du grand hon-
neur qu'il nous fait en acceptant
la présidence de cette thèse.*

A la mémoire de M. le Professeur BRIN
Professeur de Clinique chirurgicale à l'École de Médecine d'Angers

A la mémoire de M. le Professeur TESSON
Professeur de Clinique chirurgicale à l'École de Médecine d'Angers

A M. le Professeur BOQUEL
Directeur de l'École de Médecine d'Angers

A M. le Professeur PAPIN

Professeur d'Histologie à l'École de Médecine d'Angers

A M. le Professeur DENÉCHAU

Professeur de Clinique médicale à l'École de Médecine d'Angers

A M. le Docteur NÉDELEC

Ancien chef de Clinique chirurgicale

**A TOUS NOS MAÎTRES DE L'ÉCOLE
ET DE L'HÔPITAL D'ANGERS**

A MES MAÎTRES DE L'INSTITUT PASTEUR

A M. le Docteur RENÉ MARTIN

Médecin de l'Hôpital Pasteur

*Qui nous a inspiré le sujet de cette
thèse. Témoinage de notre pro-
fond attachement et de notre re-
connaissance.*

A M. le Docteur GEORGES LOISEAU

Chef de Service à l'Institut Pasteur

*Qui dans ce travail nous guida tou-
jours avec bienveillance et nous
conseilla de toute sa grande auto-
rité, en gage de notre respectueuse
gratitude.*

A M. le Docteur SCHOËN

Chef de Service à l'Institut Pasteur

*Qui nous a aidé de toute sa haute
compétence pour la partie chimi-
que de ce travail, nous l'en remer-
cions bien vivement.*

A M. le Professeur A. PETTIT

Membre de l'Académie de Médecine

Chef de Service à l'Institut Pasteur

A M. le Docteur A. LAFFAILLE

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur

A M. R. VEILLON

INTRODUCTION

En 1888 Roux et Yersin, dans leur premier mémoire publié dans les Annales de l'Institut Pasteur, vulgarisant la découverte de Klebs (1883) et de Loeffler (1887) indiquèrent les caractères tant cultureux que morphologiques permettant de faire le diagnostic du bacille diphtérique d'une façon pratique et rapide.

Depuis cette époque, un grand nombre de chercheurs s'attaquèrent au problème du diagnostic bactériologique de la diphtérie dont il est inutile de souligner l'intérêt, et s'efforcèrent de perfectionner cette méthode, afin de la rendre plus aisée pour la répandre davantage, plus rapide comme l'exige le traitement, plus certaine, afin d'écarter les causes d'erreur dues plus particulièrement à la ressemblance du bacille diphtérique avec les bacilles diphtérimorphes. L'étude de la forme du bacille, de ses propriétés tinctoriales furent ainsi poussées très loin et eurent le grand mérite d'éliminer d'une façon presque certaine le bacille d'Hofmann qui est en fait la principale cause d'erreur.

Par la suite les chercheurs s'attachèrent à modifier le milieu de culture soit par enrichissement de ma-

nière à obtenir la culture du bacille diphtérique dans le plus court délai possible, soit en cherchant à augmenter ses propriétés électives, soit en se contentant d'obtenir des colonies dont les caractères les distinguent nettement des colonies de toute autre bactérie.

Depuis la publication de Roux et Yersin jusqu'à ces derniers temps, beaucoup de milieux furent proposés répondant plus ou moins au but proposé, mais malgré leurs qualités d'ailleurs très inégales, aucun n'avait remplacé le sérum coagulé.

Dans ces dernières années deux auteurs, l'un Allemand, Clauberg (avril 1931), l'autre Anglais, Anderson (septembre 1931), ont chacun mis au point un milieu qui, d'après leurs auteurs et d'après un certain nombre de publications serait digne de remplacer le sérum coagulé pour la recherche du bacille diphtérique.

Ces milieux seraient d'une part, plus sensibles que le sérum et permettraient de mettre en évidence le bacille de Loeffler dans un plus grand nombre de cas, d'autre part grâce à l'aspect des colonies de bacilles diphtériques, le diagnostic se trouverait considérablement simplifié, de plus Anderson se basant sur l'aspect que prennent sur son milieu les colonies de bacilles diphtériques et sur la manière dont ce bacille se comporte en présence de milieux à l'amidon, dissocierait ce germe en trois groupes correspondant à des différences marquées du pouvoir pathogène.

Ce sont ces données nouvelles que nous avons voulu étudier ici.

Dans ce travail nous nous efforcerons d'abord d'éta-

blir une comparaison entre les cultures sur sérum coagulé, sur milieu de Clauberg et sur milieu d'Anderson ; dans un second chapitre nous aurons en vue l'étude de la dissociation du bacille et ses réactions vis-à-vis de l'amidon.

HISTORIQUE

Les deux milieux les plus anciens qui sont à l'heure actuelle de beaucoup les plus répandus sont d'une part le milieu de Loeffler, au sérum glucosé surtout employé à l'étranger, et, d'autre part, le sérum coagulé sans addition d'aucune autre substance employé en France tel que l'ont indiqué Roux et Yersin dans leur premier mémoire sur la diphtérie en 1888. Ces deux milieux, de valeur semble-t-il égale, sont assez électifs et rapides pour permettre de faire un diagnostic en 15 à 18 heures dans les cas d'angines. Le bacille diphtérique se développe beaucoup plus vite et plus abondamment que les autres germes associés. Dans le cas d'angine c'est dans les 18 premières heures une culture presque pure qu'on obtient ; chez les porteurs il n'y a guère que le staphylocoque qui s'y développe avec quelque vigueur et ce qui est plus gênant le faux diphtérique : le bacille d'Hofmann.

On peut diviser en trois grands groupes, qui correspondent à trois époques les tendances présidant aux modifications que les chercheurs apportent aux deux milieux usuels.

a) Dans une première époque les reproches qu'on adresse à ces milieux visent d'abord leur état physique (on leur reproche leur opacité ou mieux leur transparence) et ensuite la difficulté de se procurer du sérum stérile en assez grande quantité ;

b) Dans la seconde époque, les recherches se tournent vers l'électivité et sa contre partie l'enrichissement ;

c) Dans les dernières années, la qualité recherchée sera la différenciation qui est en quelque sorte l'union et la mise en valeur de l'électivité et de l'enrichissement.

A). — PREMIÈRE PÉRIODE. — Pour obtenir un milieu clair à base de sérum, on rend incoagulable les albumines par l'addition d'alcali. Selon les quantités d'alcali ajoutées ou il y a gel clair ou le sérum ne se coagule pas, la gélose ajoutée donne alors la consistance voulue. Tels sont les milieux de Kanthack et Stephen (1896), Lorrain Smith (1894), Cobbet (1898).

Pour suppléer au sérum, on utilise le liquide d'hydrocèle (Hayward, 1914), le blanc d'œuf (L. Martin) l'œuf total (Dorset Capaldi 1898).

Ces deux sortes de tentatives ne donnèrent pas de résultats intéressants : l'alcalinisation retarde les cultures qui restent pauvres. Les matières suppléantes du sérum sont soit sans qualité nutritive, soit sans pouvoir sélectif. Ce genre de recherches est donc abandonné depuis longtemps. On doit cependant signaler en 1932 l'essai de Lorentz qui préconise un milieu gélosé à base de soja et de cystine. Ce milieu transparent pourrait être

fondue et réparti au fur et à mesure des besoins et donnerait des résultats à peu près égaux à ceux du sérum coagulé. On conçoit que dans certaines circonstances il puisse rendre service.

B) DEUXIÈME PÉRIODE. — *Enrichissement et sélectivité.* — Successivement, on présente le milieu à l'œuf (Lubenau 1908) après Dorset Capaldi (1898) et au sang (Cantani). Pope étudiant ces deux sortes de milieu donne l'avantage à ceux à l'œuf. En 1913 Drigalski et Bierat préconisent l'addition de la bile aux milieux usuels pour en augmenter la sélectivité. Gildemeister et Gunther (1913), Buzing (1914), Schürmann et Hellen (1915), Odole (1918), montrent que l'addition de bile n'est d'aucune utilité et même est nuisible.

C) TROISIÈME PÉRIODE. — *La différenciation, le diagnostic macroscopique.* La sélectivité conduisant à une culture trop maigre et inversement l'enrichissement favorisant les autres germes qui viennent gêner la culture du bacille diphtérique, en un mot, sélectivité et enrichissement s'opposant, on va essayer d'obtenir grâce aux caractères cultureux particuliers, des colonies possédant un aspect tel qu'elles se distingueront nettement des autres colonies. Il faudra d'ailleurs qu'il existe un rapport harmonieux entre la sélectivité et la richesse du milieu de façon que la culture des autres germes soit réduite ou retardée et que le développement des bacilles diphtériques soit satisfaisant, afin que macroscopiquement, sans l'aide de colora-

tion et d'examen microscopique un diagnostic puisse être porté.

Rankin fut en 1911-1912 le premier à mettre au point un tel milieu, il va utiliser d'une part l'action empêchante du sulfocyanure de potassium et d'autre part l'acidification du milieu par le bacille diphtérique en présence de glucose, mise en évidence par le rouge neutre qui vient alors teinter en rouge les colonies. Il propose la formule suivante : à trois parties de sérum de mouton, et une partie de bouillon, on ajoute 1 % de glucose, 1 % de sulfocyanide de potasse et 2 à 21 2 % de rouge neutre, le milieu est réparti dans des tubes et coagulé par la chaleur en position inclinée. L'ensemencement se fait directement avec les produits de prélèvement et l'examen après 24 à 48 heures d'étuve. S'il y a des colonies rouges, on vérifie au microscope pour assurer le diagnostic de la diphtérie ; les cultures sans colonies rouges permettent de donner sans examen microscopique une réponse négative.

Si ce milieu est vanté par Mye Coplan en 1911, par contre Hanau (1914) le montre inférieur au sérum de Loeffler et ce milieu ne rentre pas dans la pratique.

C'est à peu près dans le même ordre d'idées qu'en 1916-1917 Costa, Troisier et Dauvergne décrivirent leur milieu bleu horizon. Basé également sur l'attaque du glucose par le bacille diphtérique, avec en plus neutralisation partielle de l'alcalinité du sérum par l'acide sulfurique pour le rendre plus sensible. La formule est la suivante : à 100 centimètres cubes de sérum de cheval, on ajoute 10 centimètres cubes d'une solution de glu-

cose à 30 %, 30 gouttes de teinture de tournesol concentrée stérile et 3 cc. d'une solution stérile de $\text{SO}^4 \text{H}^2$. On distribue et on fait coaguler par la chaleur à 75° pendant 1 h. 15. Sur ce milieu bleu horizon, les colonies diphtériques apparaissent en rouge. Ce milieu donne de bons résultats en suivant strictement la technique d'ensemencement des auteurs de manière à obtenir d'emblée des colonies très isolées.

Milieux au Tellure : Conradi et Troch en 1912 eurent l'idée d'utiliser les sels de potassium et calcium du tellure ; les tellurites et les tellurates de potassium et calcium ont, en effet, la propriété d'être assez sélectifs à faible dose dans les milieux ; ils inhibent la croissance de la plupart des germes et il n'y a guère que le bacille diphtérique, le staphylocoque, le streptocoque et le bacille d'Hoffmann pour laquelle cette action inhibitrice est beaucoup moins marquée (Fleming 1932). En plus, le bacille diphtérique précipite de ces sels le tellure à l'état de métal qui vient colorer en noir les colonies. Nous notons d'ailleurs tout de suite que, contrairement à ce que l'on avait pensé cette réduction des sels de tellure n'est pas propre aux seuls bacilles diphtériques mais bien commune à un grand nombre des germes.

Conradi et Troch emploient le mélange suivant : trois parties de sérum de bœuf, et une partie de bouillon, sont additionnées de 10 grammes de chlorure de sodium, de 5 gr. de peptone Witte, de 10 gr. de malatacide de calcium et 6 à 10 gr. de glucose par litre. A chaque 100 centimètres cube du mélange, on ajoute 2 cc. d'une solution de tellurate de calcium à 1 %. On distri-

bue dans des boîtes de Pétri et on solidifie à la chaleur.

Les prélèvements sont d'abord portés sur un tube de sérum de Loeffler et mis à l'étuve pendant 3 à 4 heures. La surface en est alors râclée et on reporte le produit de râclage sur les boîtes de Pétri contenant le milieu. Après mise à l'étuve les colonies prendraient un aspect typique à centre noir au bout de 24 à 48 heures.

Hanau trouve superflu cette méthode d'enrichissement par passage sur le milieu de Loeffler et ensemence directement sur le milieu Conradi. Par contre, Schürmann et Hajos (1913) pensent qu'un enrichissement est nécessaire, aussi n'est-ce d'après eux qu'après un passage en bouillon au tellure qui inhibe les autres germes et augmente le bacille diphtérique qu'on peut ensemencer sur Conradi.

Goldmater et Gunter (1913) et Wagner (1913) ne trouvent pas grand intérêt à cette méthode. Tompakow la trouve lente et sans spécificité quant à l'aspect des colonies.

En 1914, Smith apporte une variante au milieu de Conradi par l'emploi d'un sérum gélosé à l'acide tellurique. Les résultats ne sont pas meilleurs.

En 1922, Pergola établit également un milieu, voici sa composition :

Sérum de sang normal (Bœuf ou cheval).	50 cc.
Solution de chlorure de sodium à 8 %.	50 cc.
Solution de tellurite de potasse à 2 %	1 cc.
Jaune d'œuf.	n° 4

Là encore le matériel de prélèvement est émulsionné dans un à deux centimètres cubes de bouillon et mis à l'étuve 4 à 5 heures et reporté ensuite sur le milieu.

Ces méthodes d'enrichissement sont une grande complication, pleines d'inconvénients dans la pratique courante. Aussi Douglas (1922) et après lui un grand nombre de bactériologistes pensent-ils qu'il est plus simple de combattre l'action empêchante du tellure par les propriétés nutritives accrues du milieu sur lequel l'ensemencement peut ainsi être effectué directement ; cet auteur utilisera un milieu additionné de trypsine qui rend la culture du bacille diphtérique plus riche.

Allison et Ayling (1929) et Petsch et Kraner (1930) décrivent un milieu très riche à base de sang et d'œuf et également très sélectif car en plus du tellurite de potassium, ils ajoutent du sulfate de cuivre. Mais sur ce milieu le bacille diphtérique est tellement déformé qu'il faut pour assurer le diagnostic un passage sur sérum coagulé d'où retard notable dans le diagnostic.

Enfin en 1931 presque à la même époque Clauberg en Allemagne et Anderson en Angleterre vont décrire chacun un milieu dont les qualités étudiées et vantées dans un certain nombre de publications sont telles qu'elles nous semblent intéressantes à être expérimentées et comparées avec le milieu au sérum coagulé. Nous allons donc dans les pages qui suivent décrire ces milieux et indiquer les résultats de nos recherches.

A signaler pour compléter cet historique l'intéressante application que Milenska et Szwojnicksa ont fait pour le diagnostic de la diphtérie de la microméthode de Sierakowski.

MILIEU DE CLAUBERG

Clauberg décrit en 1930 un premier milieu favorisant, dit-il, électivement la croissance du bacille diphtérique, de sorte que dans beaucoup de cas le diagnostic puisse être porté par le seul examen macroscopique.

Ce milieu était composé de gélose au sang chauffé de Lœwenthal, additionné d'un quart de son volume et de 4 % d'une solution à 1 % de tellurite de potasse. Mais aux dires mêmes de l'auteur la valeur du milieu était variable avec les ascites employées et en 1931, il proposait une nouvelle formule, à base de gélose-sang glycérinée dont Cantani (1912) avait déjà vanté les qualités pour la culture du bacille diphtérique, et à laquelle il ajoutait 0,04 % de tellurite de potassium. Voici d'ailleurs sa préparation telle que l'indique Clauberg :

A) Mélange d'une partie de sang pour deux parties d'eau. Le sang (de bœuf ou de mouton) est directement recueilli dans l'eau stérile par saignée aseptique à la jugulaire de l'animal, en ayant soin d'agiter pendant la saignée pour éviter toute coagulation.

Ce mélange devra être préparé avec beaucoup de soins et peu de temps avant son emploi car il se contamine facilement.

B) Préparation du mélange gélose-sang glycérimé. Il comprend deux temps :

a) préparation du glycérolate dit de Cantani, c'est-à-dire mélange de sang et de glycérine ;

b) préparation de la gélose ;

c) préparation de la solution de tellurite de potassium.

a) *Préparation du glycérolate* : Clauberg le fait dans la proportion de deux parties de sang de mouton pour une partie de glycérine stérile. Dans cette proportion le sang se coagule et il est nécessaire d'employer du sang défibriné.

Cantani dans son article original mélangeait parties égales de sang et de glycérine, dans ces conditions il est inutile de défibriner le sang. D'ailleurs ayant expérimenté l'un et l'autre mode, nous n'avons pas noté de différence dans les cultures.

Ce mélange est mis à la glacière et conservé cinq à six semaines de manière à le rendre stérile.

b) *Préparation de la gélose* : On emploie une gélose à 3 % préparée avec un bouillon au pH de 7,5.

c) *Préparation de la solution de tellurite de potassium* ($\text{Te}^2. \text{O K}^3$). C'est une solution à 1 % dans l'eau distillée. On stérilise à 110° pendant une demi-heure, la stérilisation à une température supérieure provoque un léger trouble de la solution.

Nous avons fait le mélange de la façon suivante : 7 cc.5 de gélose à 3 % était répartie dans des tubes. Ces tubes étaient portés à l'étuve à 120°, ce qui assurait à la fois la liquéfaction et la stérilisation de la gélose. On

la refroidissait à 45°-50° et on ajoutait 7 cc, 5 du mélange sang et eau ; 0 cc. 35 du glycérolate et 0 cc. 60 de la solution de tellurite de potassium.

Par refroidissement le milieu se prend en gelée rouge cerise transparente de consistance assez ferme. Après séjour à l'étuve pour éprouver sa stérilité le milieu prend une teinte rouge brun. Nous avons employé les tubes de Legroux au lieu des boîtes de Pétri, ils donnent une surface à peu près semblable et diminuent les risques de contamination.

MILIEU D'ANDERSON

Dans un article paru en 1931, dans le *Journal of Pathology and Bacteriology*, Anderson, Happold, Mac Léod et Thomson après une étude sur la différenciation du bacille diphtérique en trois types — dissociation que nous étudierons ultérieurement — préconisaient un milieu qui non seulement permettrait de faire le diagnostic macroscopiquement et le diagnostic de la dissociation du bacille diphtérique, mais encore décèlerait une plus grande quantité de cas positifs que le milieu au sérum de Loeffler.

Se basant sur le fait qu'un bouillon stérilisé par filtration et dont la température n'atteint jamais le point d'ébullition au cours de sa préparation était pour la préparation des milieux de culture, supérieur au bouillon usuel autoclavé (1) Anderson et ses collaborateurs indiquent ainsi la préparation de leur milieu :

« A un litre d'eau à 48°, ajouter 1 livre 1/2 à 2 livres

(1) Recherches de Gordon et Mac Léod 1916, H. D. Wright 1920, Wion 1923, Mac Léod, Welth et Phelos 1927) sur le pouvoir inhibiteur des protéines chauffées associé aux phénomènes d'oxydation qui se produisent au cours de la stérilisation.

« (livre anglaise) de viande hachée, laisser à cette
« température pendant une heure. Exprimer le jus à
« travers un linge, laisser une nuit à la glacière. Fil-
« trer sur papier.

« A 1000 cc. de ce filtrat ajouter 20 gr. de peptone
« (P. D. et Cie) et 5 gr. de chlorure de sodium, chauffer
« à 45° jusqu'à dissolution. »

« *Réaction* : Chauffer 50 cc. de ce filtrat à 80-90° pen-
« dant 15 minutes. Filtrer sur papier. Déterminer la
« quantité de soude requise pour amener au pH 7,6
« cette quantité de filtrat avec les moyens usuels d'indi-
« cation de la réaction. Ajouter au reste du bouillon la
« quantité d'alcali nécessaire calculée sur cette base.

a) Filtrer sur filtre clarifiant Seitz, K;

b) Filtrer sur bougie Chamberland stérilisée;

c) Répartir en tubes, 1 à 2 tubes sont contrôlés à
30° pendant 3 jours. Tous les autres tubes seront con-
servés à la glacière;

d) Mélange à parties égales de ce bouillon et de l'eau
contenant 5 % de gélose;

e) Ajouter 7 à 10 % de sang fraîchement défibriné de
lapin et 0,04 % de tellurite de potassium;

f) Mêler et chauffer à 75° pendant 10 à 15 minutes
avant de répartir en boîtes ».

La préparation du milieu d'après les auteurs est
d'une technique assez délicate. Le D^r A. Lafaille qui en
1931 avait étudié au laboratoire de l'Institut Pasteur,
le milieu d'Anderson a bien voulu nous faire profiter
de son expérience à ce sujet.

Pour la préparation de la gélose à l'eau à 5 % il est

nécessaire de faire tremper la gélose coupée en très petits fragments et placée dans un nouet de gaze, pendant 24 heures. Pour assurer la liquéfaction complète de la gélose il est nécessaire de la chauffer plus d'une heure. La gélose fondue et stérile doit être refroidie à 50° ; pour ne pas amener une prise en masse de la gélose, il est nécessaire de chauffer le bouillon à 45°-50°, cette température ne sera pas dépassée, pour éviter la production de précipités dans le bouillon.

Ce n'est que lorsque le mélange sera bien homogène qu'on le portera à 75° et que l'on répartira à cette température dans les tubes ou boîtes.

Ne disposant pas de peptone P. D. et C^{ie} nous avons employé le liquide d'hydrolyse pepsique des panses de porc (Louis Martin) employé couramment au laboratoire de la Diphtérie pour la préparation des milieux depuis 1894.

Comme pour le milieu de Clauberg, nous avons employé une solution mère de tellurite de potassium à 1%. Le milieu réparti dans les tubes de Legroux, est opaque, de consistance très ferme, sa couleur varie du brun jaune au brun rouge, selon la quantité de sang et lui a fait donner le nom de « *milieu chocolat* ».

SÉRUM COAGULÉ ET SÉRUM DE LOEFFLER

Nous ne rappelons ici que très brièvement la confection du milieu au sérum coagulé tel qu'il est préparé à l'Institut Pasteur, et tel qu'il nous a servi dans nos expériences : Prise de sang stérile dans la jugulaire suivant la technique de Nocard, coagulation spontanée, le sérum est recueilli aseptiquement et distribué dans des ballons de 200 cc. stérilisés au four à flamber, scellés à la lampe, stérilisés par tyndallisation (trois chauffages à 56° à 24 heures d'intervalle) ou par filtration. Répartition au fur et mesure des besoins dans des tubes de 17, coagulation en position inclinée à 90°.

Ce milieu est blanc jaunâtre opalescent. A noter que sur une épaisseur de 3 à 4 millimètres, c'est-à-dire l'épaisseur sur lequel il se présente dans les boîtes de Pétri ou les tubes de Legroux, il est d'une transparence nettement supérieure à celle du milieu de Clauberg.

La préparation du milieu de Loeffler est la suivante :

A trois parties de sérum (bœuf, cheval ou mouton), on ajoute une partie de bouillon peptoné contenant 1% de glucose, répartition dans les tubes mis 1 à 2 heures par jour pendant 3 jours à l'étuve à 65° en position inclinée, le dernier jour on porte la température à 68° 70°. Le milieu est blanc jaune opalescent.

DIAGNOSTIC COMPARÉ SUR SÉRUM COAGULÉ ET SUR MILIEUX DE CLAUBERG ET D'ANDERSON

Nous étudierons successivement : a) l'aspect des colonies ; b) l'aspect microscopique des préparations.

a) *Aspect des Colonies.* — L'aspect des colonies du bacille diphtérique sur le milieu au sérum coagulé est bien connu. Roux et Yersin en 1888 disent à leur sujet qu'au bout de 24 heures « elles se présentent sous formes de petites taches arrondies, blanc grisâtre, dont le centre est plus opaque que la périphérie » en vieillissant elles grandissent et leurs caractères s'affirment.

Quels aspects ces colonies ont-elles sur les deux milieux au tellure ?

Tout d'abord nous devons dire à la fois pour le milieu d'Anderson et pour celui de Clauberg qu'en général toutes les colonies qui poussent sur ces milieux au tellure sont noires ou mieux gris noires. Nous n'avons observé que de très rares fois, des colonies blanchâtres :

1° Lorsqu'il s'agissait de colonies très jeunes (d'ailleurs de n'importe quelle bactérie) qui très rapidement se teintaient ;

2° Dans une culture sur milieu d'Anderson datant de 4 à 5 jours, un coccus se présentait en colonies blanches.

Il nous a donc semblé qu'on ne pouvait pas tenir compte dans le diagnostic de la couleur des colonies, la gamme variant dans des limites très étroites et non spécifiquement pour un germe donné. Himmelweit conclut dans le même sens : « le pouvoir réducteur du bacille diphtérique pour le tellure n'est pas spécifique.

Sur son milieu, Clauberg indique que le bacille diphtérique, au bout de 15 à 24 heures, donne des colonies de 2 mm. de diamètre et plus généralement de $3\frac{1}{4}$ à 1 mm. Elles sont rondes, plates, à bord régulier, opaques, d'aspect sec, par réfraction de couleur gris jaunâtre clair. A la loupe, on note que le centre de la colonie qui occupe les $\frac{3}{4}$ de la surface est d'un gris plus foncé.

L'aspect des colonies que nous avons observé ne répond pas absolument à cette description. Si les colonies sont bien rondes, à bord régulier, opaques, et si lorsqu'elles sont bien développées elles présentent un centre légèrement mamelonné, nous n'avons pas noté cette différence de coloration entre le centre et la périphérie. Pour obtenir plus de finesse et se rapprocher du type décrit par Clauberg nous avons fait varier le taux du tellure sans que cela d'ailleurs influe sur l'aspect des colonies. Fréquemment après 18 à 24 heures les colonies de bacilles diphtériques ont un diamètre inférieur à 1 mm., et leurs caractéristiques, en particulier, le centre mamelonné qui paraît être le principal caractère distinctif, est bien difficilement décelable, si bien que, dans de nombreux cas que nous étudierons par la suite, l'aspect des colonies n'est pas spécifique.

Par contre, au bout de 48 heures les colonies ont un aspect typique : atteignant 3 à 4 mm. de diamètre, elles sont noires grisâtres, unies, plates, en général à contours réguliers, mais quelquefois légèrement festonnés, le centre en est surélevé, mamelonné.

Les faux diphtériques donnent des colonies plus petites que celles du bacille diphtérique : elles sont rondes unies, noires grisâtres, bombées en tête d'épingle et leurs dimensions ne s'accroissent pas.

La différenciation avec les colonies de 18 à 24 heures du bacille diphtérique est difficile et d'après Clauberg lui-même il est nécessaire de faire une préparation microscopique pour assurer le diagnostic.

Les streptocoques donnent sur ce milieu des cultures très maigres en colonies ponctiformes.

Enfin, on observe des colonies plates, peut-être plus grisâtres, non ombiliquées, muqueuses, gluantes lorsqu'on les touche au fil de platine ; d'autres ont le centre granité ou en turban, ces différentes sortes de colonies sont dues à des cocci se colorant par la méthode de Gram.

Tel est l'aspect des colonies qu'on rencontre d'une façon courante sur le milieu de Clauberg.

Sur le milieu d'Anderson ce n'est qu'au bout de 48 heures que les colonies de bacilles diphtériques prennent un aspect typique et nous avons observé les deux types principaux de colonies décrits par Anderson et ses collaborateurs.

On obtient soit des colonies de 2 à 3 mm. plus ou moins bombées, quelquefois mamelonnées, gris noir,

brillantes, unies. Leur bord est régulièrement circulaire : elles correspondent au type Mitis.

Les colonies du type Gravis sont peut-être d'une dimension légèrement supérieure, elles sont plus plates, leur centre est bien marqué, leur contour est irrégulier, festonné et du centre partent des radiations plus ou moins marquées. Par suite elles n'ont pas l'aspect uni des colonies précédentes, enfin elles sont noires, leur aspect est terne.

Entre ces deux types il existe toute une gamme de transition : on observe des colonies brillantes à contour irrégulier, d'autres avec des ébauches de striation, etc...

Mais au bout de 18 à 24 heures les colonies ont rarement cet aspect. La plupart du temps elles sont ponctiformes mesurant moins d'un millimètre de diamètre et les caractères distinctifs sont difficilement appréciables.

Pour ce qui est des autres germes usuels on note que sur ce milieu le faux diphtérique y pousse mal, ses colonies au bout de 48 heures sont petites, noires, bombées, surélevées, brillantes et régulières.

Le staphylocoque y donne des colonies granitées très dures, comme incrustées dans le milieu et il est très difficile de les prélever avec le fil de platine.

Le streptocoque y donne de fines colonies noires.

B) *Aspect microscopique des préparations.* — Bien que le polymorphisme du bacille diphtérique soit assez grand sur des cultures sur sérum coagulé datant de 6

à 48 heures, le bacille conserve toujours des caractères tels que son diagnostic pour un observateur expérimenté en est toujours aisé et sûr. Nous ne reviendrons pas sur ses caractères maintes fois exposés. Il suffit de rappeler que son incurvation sur son grand axe, ses extrémités arrondies parfois renflées, sa disposition en L, en V ou en paquet d'épingles sont des caractères pour ainsi dire constants et qui permettent de le distinguer du bacille d'Hofmann, qui à beaucoup près est la principale cause d'erreurs. Ce n'est en effet qu'exceptionnellement qu'on rencontrerait un culis dans un prélèvement de gorge ou même de nez et le culis est à peu près le seul germe usuel capable d'être confondu avec le bacille diphtérique. Ainsi que l'ont montré à la fois l'expérience et les comparaisons avec les réactions chimiques et biologiques l'examen microscopique d'une culture sur sérum coagulé permet pratiquement d'assurer si le bacille observé est ou n'est pas diphtérique.

Voyons maintenant l'aspect du bacille diphtérique sur les deux autres milieux.

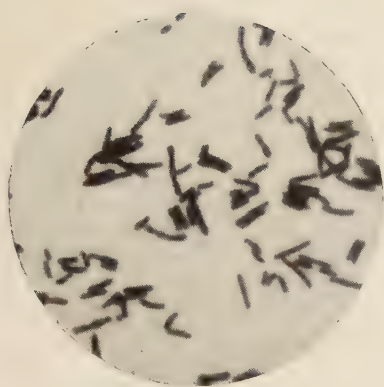
Tant sur l'un que sur l'autre milieu sa forme en est profondément modifiée. Sur milieu de Clauberg le bacille est court, trapu, sans extrémité renflée ou qui plus est aux extrémités pointues, en grain d'orge rappelant le bacille d'Hofmann, certains présentent des formes en bouteille avec une très grosse extrémité, quelques-uns sont bien massués mais alors leur aspect est réellement difforme, d'autres par contre sont de véritables coccibacilles ou même des cocci.

Il en est de même sur le milieu d'Anderson où les dif-

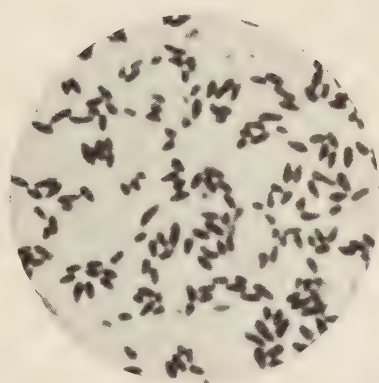
difficultés de l'examen microscopique avaient été vues et étudiées par notre collègue le Dr Laffaille dès 1931. Sur celui-ci on observe moins de forme irrégulière et où le bacille est encore plus court que sur le milieu allemand. Cette déformation est provoquée par le tellure ainsi que nous l'a montré une culture sur sérum coagulé additionné de tellure. Par ailleurs cette modification de forme par une substance empêchante est classique et Pope et Pinfields (1932) ont montré que les bacilles cultivés sur milieux additionnés de sulfate de cuivre devenaient véritablement cocciformes. Reporté sur le sérum coagulé, le bacille diphtérique isolé sur milieu de Clauberg ou d'Anderson y pousse selon ses caractères classiques, il reprend sa forme microscopique habituelle et rien ne permet de le distinguer de celui qui avait été ensemencé directement, sans passage sur milieu au tellure.

Quoi qu'il en soit nous voyons nettement que l'examen microscopique de telles cultures donne des renseignements des plus aléatoires, d'autant plus que le bacille d'Hofmann prend un aspect tout à fait similaire au bacille diphtérique avec cependant sur le milieu de Clauberg moins de formes irrégulières. Mais la différenciation n'en reste pas moins difficile ainsi que le montre la planche ci-contre.

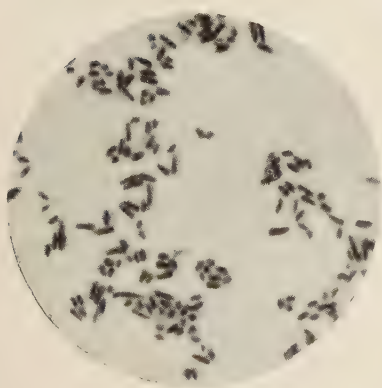
Ainsi nous tenons à noter dès maintenant combien il nous semble grave de ne pouvoir compter sur un examen à la fois si aisé et dont l'expérience a montré toute la valeur. Cette objection semble d'ailleurs avoir échappé aux promoteurs et aux expérimentateurs des



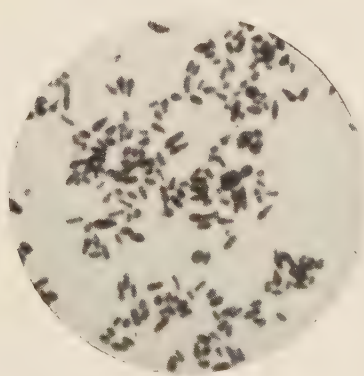
Bacille diphtérique K
Culture de 24 heures sur sérum coagulé



Bacille de Hofmann
Bacille en grain d'orge ou en navette
Culture de 24 heures sur sérum coagulé



Bacille diphtérique K
Culture de 24 heures
sur milieu de Clauberg



Bacille diphtérique K
Culture de 24 heures
sur milieu d'Anderson

Photo Jeantet

× 1800

deux méthodes. Clauberg ne parle pas dans sa communication de l'aspect microscopique. Anderson ne la signale qu'incidemment et pourtant un peu plus loin, il note que sur son milieu, on ne distingue pas toujours facilement les colonies de *Mitis* avec certaines dues aux bacilles d'Hofmann.

Weigman et Degn dans une étude du milieu de Clauberg ne disent-ils pas que la différenciation microscopique n'est pas toujours assurée entre bacilles diphtériques et faux diphtériques.

En résumé, nous voyons que contrairement au sérum coagulé, où le diagnostic macroscopique est un adjuvant au diagnostic microscopique, dans ces nouvelles méthodes on ne saurait compter que sur l'aspect des colonies, l'examen microscopique n'étant qu'un adjuvant à notre sens d'assez peu de valeur.

STATISTIQUE

Ces deux milieux ont été expérimentés en dehors de leurs auteurs par quelques bactériologistes étrangers qui ont fourni des statistiques. En France la seule étude faite à ce propos est celle de Tempé qui n'étudie que le premier milieu de Clauberg.

Voici au sujet de leurs milieux les chiffres donnés par Anderson et ses collaborateurs : 607 cas ont été examinés dont 515 se sont montrés négatifs avec l'une et l'autre méthodes.

Il y eut 92 cas positifs soit 15,15 % par l'une et l'autre méthodes. De ces 92 cas : 78 soit 84,78 % furent positifs par l'une ou l'autre méthodes.

Onze cas soit 11,96 % furent positifs sur milieu chocolat et négatifs sur le milieu de Lœffler. Par contre trois furent positifs sur milieu de Lœffler et négatifs sur milieu d'Anderson soit 3,26 %.

Mais nous faisons remarquer qu'Anderson dit « lorsqu'une différence après examen de 24 heures entre un cas positif sur milieu de Lœffler et négatif sur milieu au tellure était obtenu, le bacille était isolé et contrôlé par les sucres et sa virulence était étudiée. L'ensemencement

cement sur tellure, était observé 7 à 20 heures après pour voir si la différence était définitive. Quand il y avait une différence inverse elle était considérée comme définitive puisque habituellement un tube négatif sur Lœffler après 18 à 24 heures est considéré comme négatif, l'apparence microscopique au bout de 48 heures n'étant pas considérée comme digne de confiance ».

Anderson a fait 531 lectures à vue. Dans 486 l'examen macroscopique a suffi. 14 cas soit 2,64 % ont demandé un examen microscopique. Dans 31 cas une étude de la fermentation des sucres fut nécessaire. Après lecture au bout de 18 heures il y eut 6 méprises, donc dans 91,62 % des cas le diagnostic macroscopique aurait été possible. Dans cette statistique Anderson n'indique pas les proportions de cas positifs et de cas négatifs. C'est pour le milieu chocolat la seule étude numérique que nous avons recueillie, Piaceska Zeyland l'étudiant la rejette sans fournir de chiffres.

Pour le milieu de Clauberg voici les statistiques indiquées par l'auteur. Sur les 5000 examens pratiqués il y en eut 3634 négatifs soit 72,7 % où le seul diagnostic macroscopique a suffi. Sur les 1366 cas restants, 489 ont été déclarés négatifs après examen à la loupe. Les 868 cas restants ont nécessité une coloration et on a trouvé 516 cas positifs.

Sur le milieu de Lœffler, il n'y eut que 419 cas positifs.

Donc il y eut 107 cas positifs sur milieu de Clauberg négatifs sur milieu de Lœffler et inversement il y eut

10 cas positifs sur milieu de Lœffler et négatifs sur celui de Clauberg.

Il y avait en tout 526 cas de diphtérie. Le pourcentage d'erreur fut donc de 20,3 % sur milieu de Lœffler et 1,9 % sur milieu de Clauberg.

A noter que l'aspect macroscopique n'a été suffisant que pour les cas négatifs et que dans tous les cas de diphtérie l'auteur a eu recours à l'examen microscopique sans indiquer dans quelle proportion un diagnostic à vue eut pu être fait. Dès maintenant après ce que nous connaissons de l'aspect microscopique sur les milieux au tellure, nous nous demandons comment Clauberg a pu trancher les cas litigieux et ils sont nombreux, sans avoir recours à une étude de fermentations. Clauberg n'a pas indiqué qu'il fit cette étude.

Gratch comparant les milieux d'Allison et Ayling, de Pech et Krøner et de Clauberg, donne la préférence à ce dernier et propose cependant un autre milieu, très voisin, il est vrai, de celui de Clauberg.

Weigmann et Dejn indiquent les chiffres suivants : Sur 120 cas examinés comparativement avec milieu au sérum de Lœffler, 105 furent positifs sur les 2 milieux. Dans 18 cas, le milieu de Lœffler donne un résultat positif alors que celui de Clauberg fut négatif. Il y eut 51 cas positifs sur milieu de Clauberg qui furent négatifs sur celui de Lœffler.

Ainsi, il y eut 123 cas positifs soit 10,25 % de plus grâce à Lœffler et 156 cas positifs soit 13 % de plus par Clauberg.

Sur les cas positifs, le pourcentage de Lœffler positif

est de 70,69 % alors que sur Clauberg il s'élève à 89,65 %.

Par ailleurs Weigmann et Degn notent que sur 82 cas à diagnostic macroscopique positif il y eut 73 bacilles diphtériques et 8 bacilles d'Hoffmann. Sur 45 cas à diagnostic macroscopique douteux il y eut 29 cas de bacilles diphtériques et 16 bacilles d'Hoffmann. Sur 156 cas semblant macroscopiquement des bacilles d'Hoffmann il y eut 27 bacilles diphtériques et 129 faux diphtériques.

De son côté Himmerweit note qu'après 15 à 24 heures d'étuve 65 à 70 % des cas purent être rejetés comme négatifs. Le diagnostic des autres était porté à l'aide du microscope. Il trouve 131 cas positifs sur milieu de Lœffler et 175 sur milieu de Clauberg, quatre cas de diagnostic douteux sur milieu de Lœffler furent positifs sur celui de Clauberg, un cas de diagnostic douteux sur milieu au tellure fut positif sur milieu de Lœffler.

Piaceska Zeyland sans rentrer dans les détails indique que sur 800 cas étudiés il y eut plus d'un quart des cas positifs sur milieu de Clauberg et négatifs sur celui de Lœffler.

STATISTIQUE PERSONNELLE

Nous avons fait deux séries d'expérience :

Dans la première, nous avons comparé le milieu de Clauberg avec le milieu au sérum coagulé.

Dans la seconde, nous avons étudié comparativement les trois milieux.

Technique :

Les prélèvements (de nez et de gorge en général) ont été effectués sur des malades hospitalisés à l'hôpital Pasteur ou aux Enfants Malades pour angine et sur des contacts ou des porteurs de germes.

Les prélèvements étaient faits soit par les internes de la Consultation, soit par nous-même à l'aide d'un coton monté, tous lesensemencements ont été faits par nous au laboratoire, à l'aide d'une même spatule.

Dans la première série lesensemencements étaient faits d'abord sur sérum coagulé puis sur milieu de Clauberg. Comme il nous a semblé qu'ainsi le milieu au sérum coagulé pouvait être avantagé nous avons très vite, dans les 10 premiers cas, inversé l'ordre,

Dans la deuxième série, pour éviter cet inconvénient, nous avons établi un roulement en commençant successivement par le sérum coagulé puis milieu de Clauberg et d'Anderson, par le milieu de Clauberg puis Anderson et sérum coagulé, par le milieu d'Anderson puis Clauberg et sérum coagulé, etc...

Comme nous l'avons indiqué pour les milieux de Clauberg et d'Anderson nous avons utilisé les tubes de Legroux qui donnent une large surface d'ensemencement. Pour le sérum coagulé nous avons seulement employé des tubes de 17 millimètres de diamètre.

Dans l'un et l'autre cas nous nous sommes efforcé d'obtenir des colonies isolées surtout sur milieu de Clauberg et sur celui d'Anderson.

A l'Institut Pasteur, les tubes ensemencés avec un prélèvement venant d'une angine sont examinés le lendemain, c'est-à-dire de 15 à 18 heures après l'ensemencement. En cas d'absence de culture ou de culture négative on réexamine au bout de 48 heures. Pour les porteurs ou les contacts les tubes sont examinés seulement au bout de 36 à 48 heures.

Nous avons suivi cette manière de faire ; cependant dans un grand nombre de cas afin de nous rendre compte quel était le milieu le plus rapide, les porteurs ont été examinés au bout de 12, 18 et 24 heures.

Afin de ne pas être influencé par le résultat obtenu sur sérum coagulé, les tubes de milieu de Clauberg et d'Anderson étaient examinés les premiers. Nous notions dès cet instant l'aspect des cultures.

L'examen microscopique que nous n'avons pratiqué

dans tous les cas qu'après un sérieux examen macroscopique était fait après coloration au Gram simple avec décoloration rapide et sans recoloration à la fuchsine. Là encore les bacilles provenant de Clauberg et d'Anderson étaient examinés avant ceux provenant du sérum coagulé.

Tous les cas qui nous ont paru positifs ont été vérifiés, après isolement et purification, à la fois par l'examen des réactions des sucres (glucose et saccharose) et par la culture en gélose profonde glucosée.

Première série :

Dans cette première série nous avonsensemencé les prélèvements sur milieu de Clauberg et sur milieu au sérum coagulé.

Elle comporte 129 cas : dont 26 angines ou coryzas et 103 porteurs (Convalescents, contacts et porteurs simples).

Sur ces 129 cas, 45 soit 34,88 % permirent de mettre en évidence le bacille diphtérique sur les deux milieux.

33 cas furent positifs sur les deux milieux à la fois.

Dans 8 cas, l'ensemencement fut négatif sur sérum coagulé et positif sur Clauberg.

Par contre il y eut 5 cas positifs sur sérum coagulé qui furent négatifs sur Clauberg.

Ainsi sur les 45 cas positifs le milieu de Clauberg permit d'en déceler 40 soit une proportion de 88,89 % et le milieu au sérum coagulé donna 37 résultats positifs soit 82,22 %.

Sur les 43 cas positifs il y eut 3 angines, ces angines furent toutes positives sur l'un et l'autre milieu.

Si l'on ne considère donc que les porteurs positifs qui furent ainsi au nombre de 40, on trouve que le milieu de Clauberg en décèla 35 soit une proportion de 87,5 % et le milieu au sérum coagulé 32 soit 80 %.

Tels sont les résultats bruts pour l'un et l'autre milieu. Mais si pour le sérum coagulé l'examen microscopique permet d'assurer le diagnostic d'une façon qui ne se trouve jamais en défaut et fut confirmé par les réactions des sucres et par l'aspect de la culture en gélose profonde glucosée examinons de quelle manière peut être porté le diagnostic sur milieu de Clauberg.

Etudions d'abord *les cas positifs* : Dans 27 cas l'aspect des colonies fut tel que l'on put assurer sur le simple aspect un diagnostic positif qui fut par la suite reconnu exact.

Par contre, 13 fois il ne nous fut pas possible de conclure. Dans 4 cas nous fûmes en présence de colonies qui quoique isolées eurent des dimensions trop petites pour qu'on puisse discerner leurs caractères et par suite conclure. Dans 5 autres cas quoique de dimensions convenables les colonies ne prirent pas un aspect typique et 2 fois les colonies examinées ne ressemblaient nullement à celles du bacille diphtérique. Enfin, par 2 fois la culture fut riche au point que malgré nos précautions habituelles les colonies furent confluentes.

L'examen microscopique fut-il alors de quelques secours ? Trois fois nous eûmes un frottis nous mon-

trant exclusivement des bacilles très courts trapus en grains d'orge.

Neuf fois à côté de ces bacilles on note la présence de formes d'involution que nous avons signalées enfin une fois les bacilles avaient un aspect nettement coccoïforme. Dans aucun cas nous n'eûmes des bacilles qui permirent de faire le diagnostic positif.

Il est évident que dans les cas d'angine le diagnostic pour avoir de la valeur doit être fourni en moins de 24 heures. Or, sur les 5 angines positives une seule fois on obtint en 24 heures sur milieu de Clauberg un aspect qui permit d'assurer le diagnostic ; avec le sérum coagulé, le diagnostic des 5 angines fut assuré en moins de 24 heures.

L'étude des cas négatifs nous montre que dans 16 cas dont 4 angines nous eûmes des colonies ne permettant pas de conclure. Douze fois nous nous trouvâmes en présence de colonies punctiformes semblables aux colonies de petites dimensions que nous avons signalées ci-dessus dans les cas positifs.

Deux fois les colonies eurent un aspect douteux. Deux autres fois elles avaient un aspect qui était celui de colonie diphtérique.

Pour ces colonies, dans 11 cas l'examen microscopique montra l'existence de cocci. Les 5 autres cas furent des bacilles d'Hofmann (deux colonies punctiformes, une douteuse et deux colonies à aspect positif).

En résumé il y eut d'une part 13 cas sur les 45 cas positifs dont l'aspect macroscopique ne fut pas concluant et d'autre part 16 cas où l'aspect macroscopi-

que aurait pu en imposer pour des colonies positives. Il en résulte que le diagnostic macroscopique fut suffisant dans 100 cas sur 129 (soit 77,52 %) et que dans 23,48 % il fut insuffisant.

Enfin, nous signalerons que 4 fois nous eûmes une préparation microscopique simulant absolument le bacille diphtérique alors qu'il s'agissait de la coloration d'un mycélium (muguet pour trois cas, le dernier cas n'ayant pu être repiqué).

Deuxième série :

Dans cette deuxième série nous avons étudié les trois milieux parallèlement sur un ensemble de 137 cas. Suivant le même plan que nous avons adopté pour l'étude de la première série, nous notons que ces 137 cas se dénombrent en 42 angines et 95 porteurs.

Les cas positifs sont au nombre de 41 soit 29,93 %. Il y en eut 28 positifs pour les trois milieux à la fois.

Dans 8 cas le milieu Anderson fut en défaut, il permit donc de déceler 33 cas soit 80,49 %. Il y eut 5 erreurs pour le milieu de Clauberg et 36 résultats positifs soit 87,80 %. Pour le milieu au sérum coagulé on a 35 cas positifs soit 85,37 % et 6 erreurs.

L'analyse des cas positifs nous montre que dans 20 cas pour milieu d'Anderson et dans 22 pour milieu de Clauberg on aurait pu se passer d'examen microscopique. Mais sur le milieu d'Anderson 13 cas ne permirent pas, par le simple examen direct, le diagnostic positif. Dans ces 13 cas nous eûmes en effet, des colonies de

dimensions très réduites ponctiformes avec impossibilité de noter les caractères distinctifs. L'examen microscopique de ces 13 cas montrent que 5 fois on fut en présence de bacilles cocciformes, 5 cas montrèrent des bacilles très courts, 2 autres cas montrèrent des formes d'involution et dans 1 cas l'aspect du bacille fut semblable à l'aspect typique après culture sur sérum coagulé.

Pour le milieu de Clauberg 14 cas positifs nécessitèrent un examen microscopique : 6 colonies furent en effet ponctiformes. Cinq quoique bien développées avaient un caractère imprécis. Une autre eut un aspect franchement négatif. Enfin, dans deux cas, les colonies furent confluentes et les caractères ne purent être appréciés. Au point de vue microscopique, deux fois on trouve un aspect de cocci ou de coccobacille, 5 fois ce furent des bacilles très courts. Il y eut dans 4 cas quelques formes d'involution parmi les bacilles très courts et dans 4 cas on put observer l'aspect type du bacille diphtérique.

Au sujet des angines si dans les 9 cas positifs sur les 3 milieux on put mettre en évidence l'existence du bacille diphtérique, il est à noter que l'aspect macroscopique permit le diagnostic en moins de 24 heures pour le milieu d'Anderson une seule fois et pour le milieu de Clauberg deux fois. Pour le milieu au sérum coagulé en moins de 24 heures on eut une réponse positive ferme dans les neuf cas.

Un certain nombre de porteurs (70 cas) examinés, après 15 à 18 heures donnèrent 20 cas positifs sur sérum coagulé, 8 cas sur milieu de Clauberg, 4 cas sur milieu

d'Anderson ; nouvelle preuve de la supériorité du sérum coagulé sur les deux milieux étudiés au point de vue de la rapidité de la culture.

Analyse des cas négatifs : Sur milieu d'Anderson, il y eut 28 cas dont 10 angines dont l'aspect ne fut pas assez caractéristique pour être rejeté sans examen microscopique.

Onze fois, on eut des colonies ponctiformes, neuf fois des colonies à l'aspect douteux et dans huit cas l'aspect simula des colonies de bacilles diphtériques. Toutes ces colonies étaient formées de cocci à l'exception de deux composées de bacilles d'Hofmann et la colonie fut pour l'une douteuse comme aspect, pour l'autre elle eut l'aspect d'une colonie de bacilles diphtériques.

Pour le milieu de Clauberg il n'y eut que 17 cas de douteux (8 colonies punctiformes, 6 colonies à diagnostic douteux, 3 à aspect macroscopique positif. Parmi ces 17 cas il y en eut 13 dus à des cocci et 4 aux bacilles d'Hofmann. Trois fois les colonies d'Hofmann eurent un diagnostic douteux. Une fois l'aspect était celui du bacille diphtérique.

Sur 137 cas examinés le seul aspect macroscopique des colonies aurait pu suffire, dans 96 cas pour le milieu d'Anderson et dans 107 cas pour le milieu de Clauberg. 41 fois pour le premier milieu, 30 pour le second, il a été insuffisant c'est-à-dire respectivement dans 27,59 % et 23,33 % des cas.

DISCUSSION

Quels sont les faits qui se dégagent de ces différentes statistiques ?

Etudions d'abord les résultats obtenus avec le milieu d'Anderson, nous notons que les auteurs ont trouvé sur 92 cas positifs, 89 cas avec le milieu d'Anderson contre 79 pour le milieu de Loeffler soit une supériorité de 10,87 %.

Notre statistique comporte sur ces 41 cas positifs 35 sur milieu au sérum coagulé contre 33 sur milieu d'Anderson, soit à l'inverse des précédents auteurs une supériorité pour le sérum coagulé de 4,88 %.

Cette différence entre les deux statistiques est à notre avis due au fait déjà signalé qu'Anderson considère comme cas positif sur son milieu tous ceux qui se sont révélés positifs dans les 48 heures alors qu'il n'accepte pour le milieu de Loeffler que ceux qui se sont développés avant 24 heures. Il prétend en effet que sur ce dernier milieu au delà de 24 heures l'aspect microscopique du bacille diphtérique n'est pas considéré comme digne de confiance. Nous sommes fort étonné par cette affirmation. Nous n'avons jamais observé qu'il existât tout

au moins pour le milieu au sérum coagulé, une différence notable entre l'aspect microscopique des cultures de 24 heures et celles de plus de 48 heures. Nous n'avons pas également noté qu'au bout de 48 heures il puisse se développer davantage de bacilles dont l'aspect fut une cause d'erreur. Le Docteur Loiseau de l'Institut Pasteur, avec sa haute compétence, nous a entièrement confirmé ces données. Dans ces conditions comme nous pensons que le milieu de Lœffler se conduit à cet égard comme le milieu au sérum coagulé l'écart entre la statistique de M. Anderson et la nôtre nous paraît entièrement justifié. C'est un fait banal et courant de parler de culture retardée lorsqu'il s'agit de porteurs et quelquefois même d'angine traitée par les antiseptiques ne se développant qu'à partir de 24 heures et plus. Ainsi, à notre avis, M. Anderson ne s'est pas placé pour juger l'une et l'autre méthode dans des conditions absolument identiques puisque d'emblée il acceptait pour la culture de son milieu un espace de 48 heures alors que pour le milieu de Lœffler le temps accordé n'était que de 24 heures et sa statistique doit être envisagée avec cette réserve.

Ainsi le milieu d'Anderson ne nous a permis de déceler qu'un nombre de résultats inférieur de près de 5 % à celui fourni par le milieu au sérum coagulé.

Les statistiques pour le milieu de Clauberg sont plus favorables à ce milieu. Nous les rappelons dans le tableau suivant :

Statistique	Nombre total de cas positifs	Cas positifs sur Clauberg	Cas positifs sur sérum coagulé	Avantage de Clauberg sur sérum coagulé
Clauberg.....	526	516	419	18,44 %
Himmelweig.....	175	175	131	25,14 %
Weigmann et Degn..	174	156	123	18,96
Piaceska-Zeyland....	×	×	×	+ 25 %
Personnelle { 1 ^{re} série	45	40	37	6,67 %
{ 2 ^e série	41	36	35	2,43 %

Il est à noter que Clauberg n'a pas étudié la fermentation des sucres pour chaque souche isolée et par suite une comparaison exacte avec sa statistique nous semble difficile. Himmelweig, Weigmann et Degn n'ont pas étudié la réaction des sucres mais ont fait la recherche de la virulence pour le cobaye.

La différence qui existe entre notre première série d'expériences et la seconde est due en grande partie nous semble-t-il à ce que les ensemencements étaient pratiqués pour la première série d'abord sur milieu de Clauberg et ensuite sur sérum coagulé. Dans 2 ou 3 cas nous n'avons obtenu sur milieu de Clauberg que des colonies en nombre très réduit 2 à 3 et rien ne poussait sur le sérum coagulé.

Devons-nous attribuer la différence entre les chiffres trouvés par les différents auteurs et ceux que nous donnons à l'emploi du sérum de Loeffler au lieu du sérum coagulé nous ne le savons. Quoi qu'il en soit nous trouvons une nette supériorité au point de vue numérique, pour le milieu de Clauberg comparé au sérum coagulé et cette simple étude nous permet de placer les trois milieux dans le rang suivant : milieu de Clauberg, sérum coagulé, milieu Anderson, le sérum coagulé nous semblant à égale distance entre les milieux de Clauberg et d'Anderson.

Cependant il ne faut pas perdre de vue que le diagnostic bactériologique de la diphtérie s'il exige qu'on décèle le plus grand nombre possible de cas demande également que cette découverte soit faite avec rapidité et sécurité sous peine de perdre toute valeur. Sur milieu au sérum coagulé, nous l'avons noté, l'aspect microscopique nous donne cette certitude. Rarement on a une erreur et l'on peut conclure d'ordinaire sans avoir recours à des études complémentaires qu'on n'aurait d'ailleurs pas le temps de faire. Dans les deux autres milieux cette garantie manque par suite de la déformation du bacille par le tellurite de potassium. L'aspect microscopique devient secondaire et c'est l'aspect macroscopique combiné ou non à l'aspect microscopique qui est appelé à servir de critère. Remplit-il son rôle aussi fidèlement ? L'aspect macroscopique typique est-il bien réservé d'une façon presque certaine au seul bacille diphtérique ? Ou, seconde hypothèse, les diphtérimorphes ont-ils toujours un aspect macroscopique particulier puisque leur aspect microscopique n'est pas différenciable de celui du bacille diphtérique ? S'il en était ainsi d'après cette seconde hypothèse seuls les cocci pourraient présenter un aspect macroscopique douteux. En face d'une colonie douteuse bien vite on pourrait alors avoir une conviction : la préparation montrerait-elle un bacille quelle que soit son allure on dirait diphtérique, serait-ce un cocci on le rejetterait comme négatif et on pourrait négliger sans gros inconvénient les rares cas où le bacille aurait pris un de ces aspects cocciformes que nous avons signalés.

Malheureusement il est loin d'en être ainsi. Reprenons notre statistique : dans les 266 cas de nos deux séries : sur 33 colonies qui n'étaient pas diphtériques, il y avait 9 bacilles d'Hoffmann soit une proportion de 3,38 %. Sur ces 9 bacilles d'Hoffmann trois colonies simulèrent absolument le bacille diphtérique au point de vue macroscopique. Seul le test des sucres permit de les éliminer.

Voyons la statistique de Weigmann et Degn, elle est alors beaucoup plus éloquente et se passe de tout commentaire : 82 cas à diagnostic macroscopique positif donnent 73 bacilles diphtériques et 8 bacilles d'Hoffmann ; 45 cas à diagnostic macroscopique douteux montraient 29 bacilles diphtériques et 16 bacilles d'Hoffmann ; 156 cas à diagnostic macroscopique négatif révélèrent 27 bacilles diphtériques et 129 faux diphtériques.

Sur milieu d'Anderson nos résultats semblent meilleurs sur 137 cas il n'y eut qu'une culture des bacilles d'Hoffmann à aspect macroscopique positif et une à aspect douteux.

Mais si on se reporte à la statistique d'Anderson, on trouve que 31 fois, soit dans 5,84 % des cas il dut recourir à la fermentation.

La première hypothèse : toutes les colonies de bacilles diphtériques et elles seules doivent avoir un aspect macroscopique typique est-elle plus vraie ?

Dans notre statistique nous voyons que pour dans le milieu de Clauberg sur les 67 porteurs positifs (40 première série, 27 à la deuxième) il y eut 20 cas (13 pour le premier, 7 pour le second où le diagnostic macros-

copique fut en défaut soit près du $\frac{1}{3}$ des examens. A peine eut-il pu donner une indication semblable à celle donnée par l'aspect des colonies sur sérum coagulé. Par contre dans 5 cas négatifs les colonies avaient tous les caractères des colonies de bacilles diphtériques.

Si nous tirons la conclusion de la statistique de Weigmang et Degn que nous venons de relater nous voyons que sur 154 cas positifs ($82 + 45 + 27$) 25 fois au moins le diagnostic fut en défaut, soit dans la proportion de 16 % des cas.

Ainsi nous voyons que dans un pourcentage élevé qui n'est nullement comparable en ordre de grandeur à l'insignifiant pourcentage d'erreurs que peuvent présenter l'examen microscopique sur les préparations venant du sérum coagulé, l'aspect macroscopique aidé ou non d'une préparation microscopique peut conduire à l'erreur et n'y aurait-il que ce grief il nous semble suffisant pour condamner la méthode. Pour conclure en effet il faudra pour chaque cas isoler puis identifier, soit une perte de temps minima de 36 à 48 heures inadmissible dans la pratique.

De plus en dehors de ces nécessités pourtant primordiales d'identification, il est à noter la lenteur de ce milieu.

S'agit-il d'angine où dans moins de 24 heures le diagnostic s'impose : sur les 13 angines positives trois fois seulement le milieu de Clauberg donne une réponse positive et le milieu d'Anderson ne répond qu'une fois sur neuf. Par contre avec le sérum coagulé dans les 13 cas, le diagnostic pouvait être donné.

N'envisage-t-on que les porteurs de germes : sur 24 cas positifs le milieu d'Anderson en donne 4 de positifs en moins de 24 heures, celui de Clauberg 8 et celui au sérum coagulé 20, soit les proportions respectives d'environ 17, 34, et 84 %.

Enfin, il est à noter le prix de revient plus considérable, la complication de la préparation des milieux, ces deux griefs s'appliquant principalement au milieu d'Anderson ; la fragilité et la difficulté de conservation du milieu de Clauberg qui est un milieu seulement filtré ; la nécessité d'employer des tubes de large surface et par suite plus encombrants.

Tous ces inconvénients contrebalancent pour nous, et de loin, les quelques avantages décrits : le rejet de 70 à 80 % de cas négatifs sans préparation, à la simple vue, l'obtention de cultures pures, l'absence de liquéfaction du milieu par des germes associés.

En dehors de toute considération de rapidité et de complications dans la préparation et seulement pour les porteurs de germes l'usage du milieu de Clauberg serait à recommander en raison de sa plus grande sensibilité.

Dans cette seconde partie nous allons d'abord relater les expériences que nous avons faites au sujet de l'attaque de l'amidon par le bacille diphtérique. Cette étude incomplète et que nous continuons sera l'introduction à l'étude critique de la dissociation proposée par Anderson et ses collaborateurs et qui a essentiellement pour base, comme nous le verrons, l'aspect macroscopique pris par les colonies de bacilles diphtériques sur le milieu d'Anderson et l'attaque de l'amidon par le bacille.

ATTAQUE DE L'AMIDON PAR LE BACILLE DIPHTÉRIQUE

L'action du bacille diphtérique sur l'amidon a été peu étudiée. Il n'en est pas question dans la monographie M. R. C. de 1923. Christiansen dans une étude sur la fermentation des hydrates de carbone par le bacille diphtérique fait une revue des auteurs qui envisagèrent cette question, l'amidon n'y est pas noté : il remarque seulement qu'en 1898 L. Martin dans une étude sur la production de la toxine n'avait observé aucune modification ni aucune production d'acidité dans un bouillon amidonné à 5 %, la souche employée était la souche Am n° 8 qui sert à la fabrication de la toxine et qui comme nous le verrons ne touche pas l'amidon. On ne relève également rien dans la littérature à ce sujet si ce n'est un article de Eijkman qui en 1901 étudiait les propriétés amylolytiques du bacille diphtérique, et une publication de Gordon en 1906 proposant une méthode de diagnostic différentiel du vibron cholérique avec le bacille diphtérique le coli bacille, le bacille typhique par leur réaction sur le milieu amidonné, les bacilles diphtériques du côlon et typhique ne produisant pas cette réaction acide.

Anderson montre que certaines souches de bacilles diphtériques attaquent l'amidon soluble et il en fait un des principaux caractères de son bacille gravis. Depuis pour étudier la dissociation d'Anderson différents auteurs anglais (Parish, Whathley et O'Brien, Wright, Edin, Raulein et Edin, Menton et Robinson et Marshall ont également observé que certains bacilles diphtériques avaient une action sur l'amidon soluble.

Nous avons étudié 26 souches de bacilles diphtériques dans ce but et nous avons noté que 9 souches modifiaient le milieu amidonné.

Le milieu que nous avons utilisé est celui indiqué par Anderson : c'est du sérum de Hiss additionné soit de 1 ‰, soit de 1 ‰ d'amidon soluble de Woff-Fernbach habituellement employé à l'Institut Pasteur. Sa préparation en est simple, on mélange un volume de sérum de bœuf ou de cheval à deux volumes d'eau distillée. On tyndallise à 100° pendant 3 jours, on ajoute la quantité voulue d'une solution mère à 10 ‰ pour avoir un taux variant entre 1 ‰ à 1 ‰ d'amidon. On a ainsi un milieu opalescent, son pH. se tient aux environs de 8,0 à 8,3. A l'iode il donne une coloration bleu intense, même dans le cas de sérum avec 1 ‰ d'amidon.

Ensemencement : toutes les souches de bacilles diphtériques ne vont pas se conduire de la même manière dans ce milieu. Pour les unes il n'y a aucune modification essentielle du milieu. On note seulement, une opalescence plus marquée, plus blanche. Au fond du tube se produit un petit dépôt qui n'est guère plus considérable que celui qui se produit normalement

dans les tubes témoins. Il est dû pour la plus grande partie à un petit dépôt d'amidon et aussi au dépôt de la culture du bacille; enfin il n'y a aucune modification de la réaction à l'iode même dans les tubes abandonnés à eux-mêmes plusieurs semaines à l'étuve.

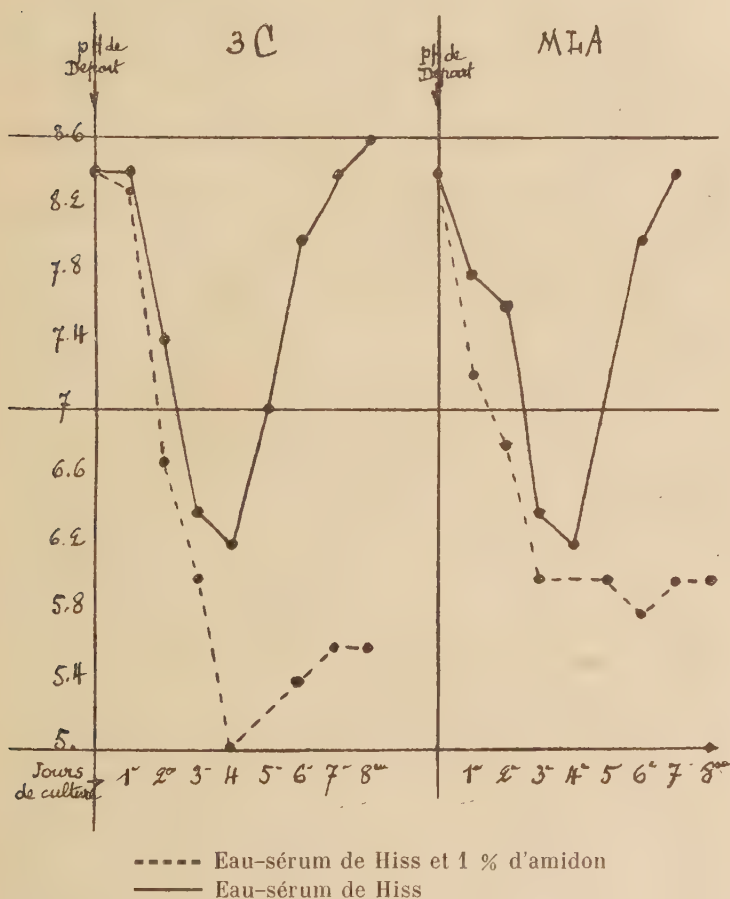
Pour les autres on constate dans les 24 premières heures un trouble important du milieu avec un volumineux dépôt au fond du tube qui occupé à peu près le $\frac{1}{3}$ de la hauteur du liquide. Puis de la 36^e à la 48^e heure il se forme un gel dû à une véritable coagulation des protéides du sérum. Le coagulum dépose et « arrache » avec lui une partie de l'amidon.

Quelle a été pendant ce temps la réaction à l'iode? Examinons un milieu ne contenant que 1 % d'amidon soluble et qui par suite est plus sensible. Si on prélève du liquide au-dessus du dépôt on voit que l'iode ne donne plus aucune réaction, mais, par contre, si on fait la prise dans le dépôt, la coloration bleue apparaît.

Les jours suivants l'iode ne donne aucune réaction, mais cependant par râclage au fond du tube après ébullition et refroidissement, on obtient une légère teinte bleutée indiquant qu'il reste encore des traces d'amidon sous sa forme initiale.

Dans les solutions plus concentrées à 1 % par exemple, au début, dans les premières 24 heures souvent dans le liquide surnageant la réaction à l'iode n'est que très faible et de plus la coloration donnée par l'iode est violet brunâtre au lieu de bleu franc. Les jours suivants cette solution se comporte comme les

solutions à 1 % mais toujours dans le dépôt la réaction à l'iode est franchement positive.



Nous avons filtré la culture et séparé ainsi le dépôt du liquide clair. Le filtrat donnait la réaction bleue à l'amidon. Le dépôt ne la donnait pas mais après

broyage et chauffage puis refroidissement il apparaissait une légère coloration violacée.

Etude de la réaction : Nous avons étudié l'acidité produite d'une part par une souche attaquant l'amidon, la souche 3 C provenant d'une angine d'un de nos malades et d'autre part une souche ne l'attaquant pas M L A provenant du laboratoire d'Anderson, cette souche représentant le type mitis. Tout d'abord dans le sérum de Hiss sans amidon l'une et l'autre souche donnent la courbe classique d'acidité avec chute du pH dans les 4 premiers jours et ensuite réalcanisation du milieu (Abl et Loiseau 1922) le pH atteint par les 2 souches au bout du 4^e jour était de 6,2.

Si nous comparons les graphiques donnés par les pH des 2 souches ensemencées sur sérum de Hiss tel quel et sur sérum de Hiss additionné de 1 % d'amidon nous constatons les faits suivants : pour la souche M L A qui n'attaque pas l'amidon la chute du pH est plus rapide en milieu amidonné ; le pH était égal à 6 au lieu de 6,2, mais au lieu de se réalcaniser le milieu reste les jours suivants au pH indiqué ci-dessus, c'est-à-dire égal à 6. La souche 3 C qui attaque l'amidon montre une chute plus profonde et plus rapide du pH. Celui-ci s'établit à 4,8 alors que sur milieu non amidonné le minimum atteint fut de 6,2. Il y eut ensuite une phase de légère réalcanisation qui porta le milieu au pH de 5,6 auquel il se maintiendra les jours suivants.

La coagulation et la modification de la réaction à l'iode se sont produites au 2^e jour, lorsque le pH était égal à 6,7.

Il est à noter que le pH du milieu ensemencé avec la souche M L A était à la même date égal à 6,8 c'est-à-dire sensiblement égal à celui du milieu ensemencé avec l'autre souche. Cependant, le pH baissa les jours suivants, par la suite à 6,2 et cela sans qu'il n'y eut aucune modification apparente de l'aspect extérieur du milieu, ni dans sa manière de se comporter vis-à-vis de l'iode.

Nous nous sommes demandé si les modifications apportées au milieu à l'amidon n'étaient pas dues à une diastase excrétée par le bacille, une sorte de coagulase telle qu'elle a été signalée par Wolff-Fernbach. Pour répondre à cette question, nous avons ensemencé du sérum de Hiss avec la souche 3 C et nous avons filtré au 2^e jour, c'est-à-dire au moment où la précipitation débutait dans le milieu amidonné, et au 4^e jour, au moment où l'acidité était à son maximum dans le sérum. Mis en présence d'une solution amidonnée de telle sorte que ce filtrat eut finalement une teneur en amidon soluble de 1 % c'est-à-dire semblable à celle du milieu sur lequel on ensemait le bacille il ne s'est produit aucune modification apparente, il n'y a pas eu de coagulation du milieu et la réaction à l'iode est restée positive même après plusieurs jours de séjour à l'étuve.

Inoculation aux cobayes. Quant au pouvoir pathogène des souches 3 C et M L A nous avons constaté que ces 2 souches tuaient le cobaye au millième.

Nous avons inoculé à des cobayes 1 centimètre cube de cultures de 12 jours de l'un et l'autre bacille sur sérum de Hiss pur et sérum de Hiss amidonné à 1 %. Le

cobaye inoculé avec la souche M L A, cultivé sur milieu amidonné, est mort en 3 jours avec lésions typiques à l'autopsie. Celui inoculé avec la souche M L A cultivé sur sérum de Hiss pur n'est mort qu'au bout de 28 jours après avoir présenté une volumineuse escharre au niveau de l'injection. Celui inoculé avec une culture sur sérum de Hiss pur de la souche 3 C est mort en 5 jours avec des lésions typiques. Pour les cultures de 3 C sur milieu amidonné nous avons injecté 1 centimètre cube de filtrat à un cobaye et un centimètre cube de dépôt soigneusement lavé à l'eau physiologique à un autre cobaye. Les deux cobayes ont survécu, le dernier ayant présenté une légère escharre au niveau de l'inoculation.

Avec des cultures de la souche 3 C, datant de *cinq jours* faites sur milieu amidonné à 0,5 et 1 % nous avons inoculé par voie sous-cutanée 4 cobayes : le premier a reçu une inoculation de 1/10 de cc. de filtrat de la culture sur milieu amidonné à 1 %, le deuxième 1/10 de cc. du filtrat de la culture sur milieu amidonné à 0,50 %, le 3^e 1/10 de cc. du dépôt, lavé à l'eau physiologique, provenant de la culture en milieu amidonné à 1 % et le 4^e également 1/10 de cc. de dépôt, provenant de la culture en milieu amidonné à 0,5 %. Les quatre cobayes ont survécu.

Aux cobayes ayant reçu l'un 1 cc. de filtrat d'une culture amidonnée à 1 % de 12 jours de 3 C, un 1/10 de cc. de filtrat de la même culture, mais ne datant que de 5 jours, nous avons après cinq semaines inoculé environ 25 doses mortelles de toxine diphtérique, le

cobaye témoin est mort en 24 heures et les deux autres respectivement en 36 et 48 heures, tous les trois avec, à l'autopsie, des lésions typiques.

Les expériences que nous venons de relater confirment tous les faits déjà signalés par les auteurs anglais à savoir que certains bacilles diphtériques attaquent les milieux amidonnés. Cette attaque se traduit par l'acidification du milieu et la disparition de la réaction à l'iode. Il y aurait donc dégradation de l'amidon par le bacille. En outre, il résulte de nos expériences que cette attaque n'est pas due à un principe filtrable du bacille. Quant à la nature de cette dégradation précédée d'une coagulation apparente et à la manière dont aussi l'amidon est décomposé dans de tels milieux, les expériences en cours nous enseigneront peut-être ce qu'il faut en penser, de même en ce qui concerne la production de la toxine diphtérique dans ce cas. Mais, dès maintenant, nous avons tenu à exposer ces faits en nous réservant la possibilité de continuer ces recherches.

ÉTUDE DE LA DISSOCIATION DU BACILLE DIPHTÉRIQUE

Anderson, en proposant son milieu, n'avait pas seulement en vue le diagnostic bactériologique de la diphtérie mais principalement la dissociation du bacille diphtérique d'après l'aspect des colonies.

Le fait que toutes les colonies de bacilles diphtériques n'ont pas sur un milieu de culture donné un aspect identique a été observé de tous temps. En général sur les milieux usuels on observe 2 types principaux.

Dès 1890, étudiant les cultures sur gélatine Klein décrivait deux types de colonies : les unes les plus grandes et les plus nombreuses ont un aspect granuleux, leur couleur est blanc gris, elles sont semi transparentes, leur centre est épais et leur bord est régulièrement arrondi ; les autres ont un centre très nettement marqué, c'est une masse arrondie, granuleuse, blanc grisâtre de laquelle partent des striations qui rayonnent sur la surface de la colonie et aboutissent à la périphérie, le contour extérieur est légèrement festonné, lorsque ces colonies sont bien développées elles prennent l'aspect dit « en marguerite » (daisy). Dans la

monographie anglaise M. R. C. les deux aspects sur gélose sont bien décrits : « Certaines colonies les plus répandues sont grisâtres, légèrement transparentes; à surface surélevée arrondie et généralement à bord réguliers et circulaires. Exceptionnellement leur bord est irrégulier et dentelé. Le centre plus épais semble plus dense et sa structure est nettement moins finement granuleuse. Les autres colonies sont plus volumineuses; plus blanches, plus régulières et très finement granuleuses, leur périphérie est presque toujours très régulièrement arrondies, leur centre est bien développé et dense. » Les auteurs ajoutent que par le repiquage des colonies, on obtient indistinctement l'un ou l'autre de ces aspects, et que nulle différence ne peut être mise en valeur dans la morphologie, le pouvoir pathogène ou les autres caractères de bacilles formant ces colonies.

Sur sérum coagulé ces deux types existent également et leur aspect est absolument superposable à celui décrit par Klein dans les cultures sur gélatine.

Hammerschlidt (1924) décrit deux types de bacilles diphtériques : A et C et des types intermédiaires. Le type A aurait un aspect macroscopique rappelant les colonies de staphylocoques, les cultures en bouillon seraient troubles et présenteraient un pouvoir hémolytique; le type C donnerait des colonies unies à bords étendus, cultivées en bouillon, elles ne le troublent pas et formeraient un dépôt, elles n'auraient pas de pouvoir hémolytique.

En 1928, Parker, étudiant un milieu gélosé et trypsiné, note trois aspects » : a) une culture peu abondante

transparente et claire, b) une culture opaque irrégulière et rugueuse et c) une culture abondante régulière opaque et lisse et il ajoute qu'il n'y a pas de relation entre ces types et la toxicité. Dimytrivic, Spith et Yovanonic (1931) sur des cultures en gélatine notent également pour les colonies des variantes. Dans ces différentes publications, les auteurs n'ont pas remarqué de corrélation entre la clinique et les types du bacille.

Sur le milieu chocolat nous l'avons déjà noté, on obtient soit des colonies petites de 2 à 3 mm. plus ou moins bombées, quelquefois mamelonnées, gris noir, brillantes unies à bords régulièrement arrondis, soit des colonies plus volumineuses, plus plates, d'un noir terne, le centre est bien marqué et de lui partent des radiations plus ou moins nettes qui vont aboutir à un bord festonné et comme dans les colonies de Klein, on obtient l'aspect en marguerite. Entre ces deux types il existe toute une gamme de transition : colonies brillantes à contours réguliers ou vice versa, ébauches de striations sur colonies bien arrondies, etc. Toutes ces constatations ont été vérifiées dès 1931 à l'Institut Pasteur par le Docteur Laffaille.

Pour Anderson, ces aspects différents correspondent en quelque sorte à des espèces bien marquées et il aurait observé que les colonies les plus petites correspondaient aux cas bénins de diphtérie alors que les autres seraient l'apanage des formes malignes ; d'où le nom de *mitis* et de *gravis* qu'il donne aux bacilles provenant de ces deux sortes de colonies, donnant le nom d'intermédiaires à ceux de la troisième catégorie. D'ail-

leurs, toujours d'après ces auteurs, l'aspect macroscopique n'est pas le seul caractère différentiel ; d'autres caractères viennent confirmer cette distinction et ils décrivent ainsi les trois sortes de bacilles en question.

Le bacille *gravis* dont les colonies présentent l'aspect en marguerite, a les caractères suivants : en bouillon il donne un voile à la surface, le bouillon reste clair avec dépôt granuleux ; ils n'ont pas en général de pouvoir hémolytique ; ils font fermenter l'amidon ; ils sont associés aux formes sévères de la diphtérie.

Le bacille *mitis* aux petites colonies régulières donne en bouillon, un trouble uniforme avec sédiment compact, une légère pellicule et un anneau ; il présente en général un pouvoir hémolytique, il ne fait pas fermenter l'amidon ; il est associé aux cas bénins.

Le type *intermédiaire* qui comprend les bacilles ne rentrant pas dans les catégories précédentes ; ne trouble pas le bouillon et produit un léger dépôt ; il ne présente pas en général de pouvoir hémolytique ; il ne fait pas fermenter l'amidon.

Cette classification est, à première vue, assez séduisante puisque chaque type est assuré non par un seul caractère, mais par un ensemble de caractères qui paraissent ainsi créer une individualité très nette à chacune des trois espèces. Mais pour baser une classification, sur des caractères, faut-il que ces caractères soient fixes ; or, à l'étude, il n'apparaît pas qu'il en soit ainsi.

L'expérience montre rapidement lorsqu'on fait des repiquages de bacilles diphtériques que telle culture qui en bouillon pousse avec voile et liquide clair sera

trouble dans un repiquage suivant pour reprendre ensuite l'aspect clair avec voile. Par contre, tel bacille qui, dans les premiers repiquages, troublait le bouillon donne ensuite un voile avec bouillon clair.

L'hémolyse ne donne pas de renseignements plus précis. Anderson d'ailleurs ne donne ce caractère qu'à titre indicatif : certains gravis ou intermédiaires étant hémolytiques certains mitis ne l'étant pas et vice versa. Il est à noter que suivant les globules rouges employés un bacille peut être ou non hémolytique (Monographie M. R. C. 23) et Schwener a montré que les bacilles de vieilles cultures perdaient leur pouvoir hémolytique.

Menton remarque les difficultés de classer les types et l'instabilité de l'aspect macroscopique. Cristiansen par une succession de repiquages et de passages dans des bouillons de pH différent, réussit à faire prendre aux mitis des formes de gravis, aux gravis des formes de mitis et transforme les intermédiaires en mitis et gravis. Il conclut que les trois types de bacilles montrent *in vitro* des variations dans la structure de la colonie particulièrement après la culture en bouillon et les variantes rugueuses dérivées de mitis peuvent à la vue être classées comme gravis et vice versa ; que les variations se montrent également dans les caractères de cultures en bouillon et dans la production de l'hémolyse. Par ailleurs Wright, Edin, Rankin et Edin concluent, sur un ensemble de 48 souches de bacilles diphtériques virulents pour le cobaye, qu'aucune classification d'après les caractères indiqués par Anderson n'est

possible vu la variabilité des types. Ainsi aspect morphologique, culture en bouillon, hémolyse, sont susceptibles de variations, il nous semble donc difficile de baser une dissociation sur ces caractères. *Un fait reste cependant c'est la modification des milieux à l'amidon par certaines souches de bacilles diphtériques.*

Pour Anderson et ses collaborateurs la sévérité du type gravis est principalement mis en valeur par les faits suivants : En étudiant la relation qui peut exister entre la gravité de la maladie ils isolent 104 cas, dont 63 seront des gravis, 6 intermédiaires, 35 des mitis. Voici comment se répartissent les trois types suivant leur origine.

	Gravis.	Interm.	Mitis.
Rhinites ou porteurs	41	0	3
Cas bénins	43	2	20
Cas moyens	21	3	11
Cas sévères	15	1	1
Cas hémorragiques	3	0	0
Total.....	63	6	35

En recherchant la virulence pour les cobayes, par la méthode intra-cutanée, Anderson constate les résultats suivants :

	Gravis.	Interm.	Mitis.
Réactions très importantes	0	0	3
Importantes	10	1	3
Modérées	33	3	17
Faibles	5	0	3
Douteuses	2	0	1
Nulles	0	2	7

Il résume ces résultats en disant « que les gravis sont rarement avirulents, alors que les mitis le sont plus souvent et il ajoute : « il n'y a cependant pas une cor-

respondance absolue entre la virulence chez l'homme et chez le cobaye puisque les trois réactions les plus graves pour le cobaye furent dues aux mitis ».

Robinson et Marshall défendent également ces points de vue, ils étudient 529 cas et trouvent 129 graves, 296 intermédiaires, et 104 mitis. Ces cas se répartissent au point de vue clinique de la façon suivante :

	Nombre de cas	Hémorra- giques	Sévères	Modérés	Bénins	Porteurs	Morts
Gravis	129	6	40	38	25	20	
		soit 6,4 %	soit 31 %	soit 29,5 %	soit 19,4 %	soit 15,5 %	15
Interméd.....	296	25	77	87	92	15	
		soit 8,4 %	soit 25,7 %	soit 29,7 %	soit 31,1 %	soit 5,1 %	44
Mitis.....	104	0	4	22	50	28	
			soit 3,8 %	soit 21,2 %	soit 48 %	soit 27 %	2
Totaux...	529	31	121	147	167	63	61

et ayant étudié dans 110 cas la virulence intra cutanée pour le cobaye, il trouve :

Réactions	Gravis.	Mitis.	Interm.
Sévères.....	7	5	14
Modérées.....	17	12	29
Légères.....	3	3	7
Douteuses.....	1	5	1
Nulles.....	0	5	1

Robinson et Marshall montrent que d'après leurs expériences, c'est surtout l'intermédiaire qui s'est montré sévère.

Menton en plus de la difficulté à classer les types note que sur 47 mitis et 21 graves, 28 mitis et 17 graves donnèrent un test positif de virulence sous-cutanée au cobaye et 94 % des graves et 78,5 % de mitis furent mortels en moins de deux jours.

Parish, Whatley et O'Brien étudiant la virulence pour

le cobaye montrent que le gravis n'est pas plus toxique que le mitis, voici le tableau qu'ils fournissent

Millions de bacilles injectés

Type	3.000	2 000	1.000	500	250	
Gravis.	<u>6</u>	<u>41</u>	<u>7</u>	<u>4</u>	<u>1</u>	<i>cobayes morts.</i>
	6	44	12	12	9	<i>cobayes inoculés.</i>
Mitis.....	<u>4</u>	<u>19</u>	<u>16</u>	<u>11</u>	<u>1</u>	<i>cobayes morts.</i>
	4	21	20	20	9	<i>cobayes inoculés.</i>

Ayant injecté à des lapins par voie sous-cutanée, intra-veineuse, ou intra péritonéale des doses variables de bacilles diphtériques gravis et mitis, il trouve que sur les 34 animaux utilisés, la mortalité pour les gravis est de 19 sur 33 et pour les mitis de 26 sur 32, soit une mortalité supérieure pour le type mitis. Enfin l'examen de 9 souches de gravis et 6 souches de mitis leur montre que ces derniers donnent une toxine titrant entre 16 et 20 unités, alors que pour les autres elle titre seulement entre 2 et 6 unités.

Ces chiffres ne sont pas aussi contradictoires qu'il semble à première vue, si pour classer les bacilles on se sert uniquement du test à l'amidon. Ainsi d'ailleurs ont agi Rankin et Marshall, Parish, Wathley et O'Brienne et les intermédiaires sont classés parmi les mitis. Dans ce cas la statistique de Robinson et Marshall indiquerait que les cas sévères ont surtout été l'apanage des formes ne faisant pas fermenter l'amidon.

Nous avons étudié le test à l'amidon pour un certain nombre de nos cas et pour certains nous avons recherché le pouvoir pathogène. Le tableau suivant résume ces résultats ;

Souches	Type sur milieu Anderson	Attaque du milieu amidonné	Pouvoir pathogène	
2	Mitis	0	+ 1/300 — 1/500	porteur.
3	Gravis	+	+ 1/1000 — 1/1500	convalescent.
6	?	+	+ 1/300 — 1/500	convalescent.
7	Gravis	+	+ 1/300 — 1/500	convalescent.
8	M	0	+ 1/100	convalescent.
10	G	+	+ 1/300 — 1/500	porteur.
20	type non classé	+	+ 1/1500	porteur.
23	?	+	—	angine.
35	?	0	— 1/100	porteur.
41	M	0	+ 1/100 — 1/300	porteur.
52	M	0	+ 1/100 — 1/300	contact.
60	M	0	+ 1/300 — 1/500	contact.
66	M	+	+ 1/100 — 1/500	porteur.
67	G	+	+ 1/1500	convalescent.
69	G	0	—	angine.
76	?	0	—	convalescent.
77	M	+	—	angine.
78	G	0	—	porteur.
80	type non classé	0	—	porteur.
81	G	0	+ 1/1000 — 1/1500	porteur.
86	M	0	—	convalescent.
87	M	0	—	convalescent.
105	M	0	—	angine.
118	M	0	—	angine.
120	M	0	—	angine.
121	?	0	—	angine.

De ces faits, il résulte que dix souches sur milieu d'Anderson, qui avaient un aspect de mitis, furent sans action sur l'amidon et qu'il y eut 4 souches à aspect gravis qui attaquèrent l'amidon. On eut 5 souches dont l'aspect des colonies ne permettait pas la classification en gravis ou en mitis. Sur ces 5 souches, 2 souches attaquèrent l'amidon, et 3 n'eurent aucune action sur le milieu amidonné, enfin 5 souches présentèrent sur milieu d'Anderson un aspect qui fut en contradiction avec le test à l'amidon, 2 souches semblant être du mitis attaquèrent l'amidon et inversement il y eut trois souches à aspect de gravis qui furent sans effet sur le milieu amidonné.

De ce petit nombre de cas, il ressort très nettement,

que si fréquemment l'aspect macroscopique correspond au test de l'amidon, il y a cependant de nombreuses exceptions et l'aspect macroscopique est souvent en défaut.

Nous avons recherché pour 14 souches prises au hasard quel en était le pouvoir pathogène. Les souches qui ont attaqué l'amidon, montrèrent, en général, un pouvoir pathogène supérieur. Mais nous nous gardons, cependant bien, de conclure sur un si petit nombre de cas. Nous ferons, en effet, remarquer, qu'il nous a été donné d'examiner 2 souches du type *mitis*, l'une M L A fourni par M. Anderson, l'autre la souche 81 provenant d'un de nos malades dont le pouvoir pathogène était pour la première supérieur au 1/1500, pour la seconde égale au 1/1000. Rappelons d'autre part que la souche A M 8 envoyée à l'Institut Pasteur en 1894 par Park et Williams, dont le haut pouvoir toxique est connu, est sans action sur l'amidon.

Il ne nous semble pas qu'on puisse tirer tant des statistiques anglaises, qui d'ailleurs ne se placent pas toutes au même point de vue, que de nos conclusions une preuve que les bacilles attaquant l'amidon, sont doués d'une malignité supérieure à ceux qui ne l'attaquent pas et dans ce sens, nous nous associons aux conclusions de Parish, Wathley et O'Brien qui critiquent les termes de *gravis* et de *mitis*. Il serait préférable de dire bacilles attaquant ou n'attaquant pas l'amidon, sans présumer de rien. Il faudra, en effet, des statistiques très étendues, englobant un très grand nombre de cas, pris à des endroits, à des moments différents,

pour pouvoir seulement assurer que l'une ou l'autre espèce de bacilles est plus maligne et cela ne pourrait être qu'une indication générale. Il est, en effet, très possible qu'à une époque donnée telle espèce soit prépondérante, qu'il y ait des épidémies, dues spécialement à tel ou tel type et qu'à un certain moment ce type puisse être tantôt très pathogène, tantôt bénin. N'observe-t-on pas ces faits dans les épidémies des autres maladies, ce qui a fait parler « du génie épidémique ». Dans notre tableau les souches ont été recueillies dans le courant des mois d'avril et mai, les souches ont été classées dans l'ordre chronologique ; or il est à remarquer qu'au début on trouve surtout des bacilles attaquant l'amidon alors que dans la dernière partie, le type le plus fréquent est celui qui ne l'attaque pas.

CONCLUSIONS

De notre étude, il résulte :

1° que si le milieu d'Anderson s'est montré nettement inférieur au sérum coagulé, par contre le milieu de Clauberg permet de déceler un plus grand nombre de cas (6 % environ d'après nos recherches) ; cependant la déformation subie par le bacille sur le milieu de Clauberg et aussi sur le milieu d'Anderson rend son diagnostic microscopique difficile. D'autre part, il serait vain de compter sur la constance de l'aspect macroscopique. Aussi, nécessitant une identification pour chaque germe douteux, le milieu de Clauberg ne saurait convenir au diagnostic bactériologique rapide de la diphtérie ;

2° que certaines souches de bacille diphtérique sont susceptibles de produire une dégradation de l'amidon. Cette dégradation se traduisant par *a*) l'acidification du milieu ; *b*) la disparition de la réaction à l'iode, le mécanisme de cette attaque restant à préciser. Mais dès maintenant on peut dire qu'elle n'est pas due à un principe filtrable du bacille ;

3° que les caractères qui ont amené Anderson et ses collaborateurs à dissocier le bacille diphtérique en trois types ne sont pas stables ainsi que l'ont déjà montré les auteurs anglais ;

4° que les souches attaquant l'amidon ne montrent pas nettement un pouvoir pathogène supérieur à celles qui ne l'attaquent pas.

Vu, le Doyen,
ROUSSY

Vu, le Président de la thèse
NOBÉCOURT.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris
S. CHARLÉTY,

BIBLIOGRAPHIE

ABT et LOISEAU G., 1922. — Réaction du milieu et production de la toxine diphtérique (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 36-535).

ALLÈN, PAUL W., 1918. — A simple method for the classification of bacterias to diastase production (*Journ. of. Bact.*, t. III, 15-17).

ALLISON V. B. et AYLING T. H., 1929. — Improved medium for isolation of BD : Trypsened serum tellurite copper sulfate agar (*Journ. of Pathology and Bact.*, XXXII, p. 299).

ALLISON V. D., 1930. — Value of copper sulphate tellurite medium for isolation of B. D. (*Brit. Journ. Exp. Path.*, XI, 244).

ANDERSON, 1923. — Public Health, XIV, 198.

ANDERSON J. S., HAPPOLD F. C. MAC LEOD J. V. and THOMSON, 1931 septembre. — Existence of 2 forms, b. diphteriæ gravis and b. diphteriæ mitis, new medium for their differentiation and for bacteriological diagnosis of diphterie (*Journ. of Path. and Bact.*, XXXIV, 667).

ANDERSON J. S., COOPER, HAPPOLD, MAC LEOD, 1933. — Incidence and correlation with clinical severity of gravis, mitis and intermediate types of B. D. in series of 500 coals at Leeds (*Journ. of Path. and Bact.*, XXXVI, p. 169).

ANDERSON, 1933. — Starch fermentation by gravis type of D. O. (*Lancet*, I, 293).

ANDREWS F. W., 1930. — Note on fermentation of starch by certain Hæmolytic streptococci (*Journ. of path. and Bact.*, XXXIII, 145).

ANDREWS F. W., BULLOCH W., DOUGLAS S. R., DREYER G., FILDES, LEDINGHAM J. C., WOLF C. G., 1923 — « Diphtheria » (*Medical Research Council*, London).

BIFFOLIO Carlo. — Riforma medi, XXXIX, n° 47, p. 1113.

BOSSE B., 1902. — Der Deyckesche Pepsin-Trypsin Agar ein Nährboden für Diphtherie bacillen (*Zentralbl. f. Bakt. I*, Abt. Origin., 33, p. 471).

BRAUN et Fr. MUNDEL, 1927. — Ueber die Bederentung des Cystins für die Zuchtung der Diphtherie bazillen (*Zentralbl. f. Bakt.*, Abt. I, t. LIII. p. 182).

BUSING E., 1914. — Ueber den Zusatz von Rindergalle zum Loefflerschen Diphtherienährboden (*Deutsche Med. Wehnschr.*, pp. 40 486).

CANTANI, 1912. — *Zentralbl. f. Bakt. Orig.* 53, p. 471.

CARTER H., 1933. — An analysis of 510 strains of corynebacteriæ Diphtheriæ (*The Journ. of Hyg.*, XXXIII, p. 542).

CHRISTISSON Mary M., 1933. — Stability of mitis, intermediate and gravis types of B. diphtheriæ (*Journ. of Path. and Bact.*, 37, p. 243).

CLAUBERG K. W., 1929. — Ueber einen Elektivnährboden für Diphtheriebazillen, de veine Makroskopische Plattendiagnostik ermöglicht (*Zentralbl. f. Bakt. Orig.* 114, p. 539).

CLAUBERG K. W., 1931. — Weiter Mitteilung zur Makroskopischen Diphtheriebazillen Diagnostik (*Ibidem*, 120, p. 324).

CLAUBERG K. W., 1933. — Ergänzende Ausfuhungen über Bronchbarkeit, Hestelbugg, und Verwendung der neuen Blutwaser-Glyserolat-Tellur Nährplatte zue bakteriologischen Diphtheriediagnostik (*Ibidem*, 128, p. 153).

COBBET, 1898. — Alkalized serum a a culture medium for the bacterial diagnosis of diphtheria (*Lancet I*, 362 et *Zentrabl. f. Bakt. I*, Abt. 23, p. 395).

CONRADI H., 1913. — Über ein neues Prinzip der elektiven

züchtung und seine Anwendung bei Diphtherie (*Munchen Med. Wchnschr.*, 60, p. 473).

CONRADI H., 1920. — Einwiderung zur Veröffentlichung von F. Schanz : Die bakteriologische diagnose ser Diphtherie (*Berl. Klin. Wchnschr.*, 57, p. 220).

CONRADI H. et BIERAST, 1932. — Ueber Absonderung von diphtherielkeinen durch den Harn (*Deutsche Med. Wchnschr.*, 38, p. 1380).

CONRADI H. et TROCH p., 1912. — Ein Verfah en zur Nachweis der Diphtheriebazillen (*Munch. Med. Wchnshr*, 59, p. 1652).

COPLANS, 1911. — Differential media for recognition of b. diphtheriæ and associated organism (*Journal of. Hygiène* II, 274).

COSTA, TROISIER et DAUVERGNE, 1917. — Sur un procédé pour la recherche et la détermination rapide du b. diphtérique chez les malades et les porteurs (*C. R. Soc. de Biologie*, XXX, 678).

COSTA. — 1917. — Notes complémentaires relatives au procédé pour la recherche et la détermination rapide de b. diphtheriæ. Ibidem XXX, 793.

COSTA, 1917. — Recherche et détermination rapide du BD. chez les malades et les porteurs (*Bull. Mem. Soc. med. des Hôp. de Paris*, 41-991).

COSTA, 1919. — Le diagnostic bactériologique de la diphtérie (*Presse Médicale*, 27, p. 113).

DEICHER H., 1927. — Zur diphtheriefrage (*Deutsche Med. Wchnschr.* LIII, 1555).

DEICHER H., 1927. — Ueber gehäuftes Auftreten ungewöhnlich bösartiger Diphtherie (*Deutsche Med. Wchnschr.* LIII, 825).

DETLING H. und SCHUM K. A. 1933. — Ein neuer Diphterienährboden, (*Zentralbl. f. Bakt. Orig.* CXXVIII, p. 139).

DIMITRIJEVICI-SPITH V. et YOVANROVIC, 1931. — Krupp und Nichtkruppstämme als geseonderte Typen der Diphtherie-

bakterien und ihre ungleichen leistungen in der Kultur und ein Kranken (*Zentr. f. Bakt.* O I CXXI, p. 64).

DOERING C. R. 1927. — Proc. Nat. Acad. of Science, U. S. A. XIII, 12.

DOCKERAY, 1934. — Differentiation of *B. diphtheriae* des virbing simple modification of medium devised by Anderson-Happold-MacLeod and Thomson (*Irish J. M. S. C.* p. 12, janv. 34).

DOUGLAS, S. R., 1922. — A new medium for the isolation of *B. diphtheria*, (*Brit. J. exper. Path.* 3, 363).

VON DRIGALSKI et BIERAST, 1913. — Ein Verfahren zum Nachweis der Diphtheribazillen und seine praktische Bedeutung, (*Deutsche Med. Wchenschr.* 39, p. 1237)

DURAND P., 1918. — Classification des *B. diphtériques* par l'agglutination (*C. R. Soc. de Biologie*, LXXXI, p. 1011).

DURAND, 1921. — Action des bacilles sur les hydrates de carbone, (*Ibidem*, LXXXIV, p. 982).

ELRIS S., 1934. — The Antigenic relation of diphtheria organism of the gravis and mitis strains (*Journ. of Bact.* XXVII, 96).

EIJKMAN C., 1901. — Ueber Enzyme der bakterien und Schimmelpilzen (*Zentralbl. f. Bakter. Orig.* XXIX, p. 841).

EÖRSI M., 1933. — Macroscopic diagnosis of diphtheria with Clauberg's culture medium (*Orvosi Kétl.* 77, 405).

FEIERABEND B. et SCHUBERT O., 1929. — Experimentelle untersuchungen mit stämmen von malignen Diphtherie (*Zeits. f. Immunitäts.* LXII, 283).

FREIDBERGER E. 1928. — Med. Klin. XXIV, 767, 810.

FLEMING, 1932. — On the special antibacterial proportion of Penicillium and tellurite of Potassium (*J. of Path. and Bact.*, 35, 11 831).

FROST W. D., CHARLTON, ALICE M. and LITTLE, MARY F. 1921. — A rapide cultural method of diagnosing diphtherie (*J. A. M. A.*, n° 76, p. 30).

GILDEMEISTER E. et GUNTHER, 1914. — Ueber neuer Verfah-

ren zum Nachweis von Diphtheriebazillen und ihre praktische Bedeutung (*Zentralbl. f. Bakt. Orig.* 72, p. 237).

GOMETZ J. de CIOMEROS, 1932. — El empleo de los mediss a base de telurite potasio en el diagnostico bacteriologico de la difteria (*Arch. de Med. Cir. y especialid* 35, p. 474).

GORDON, 1906. — *Zentralbl. f. Bakt. Orig.* XLII.

GORDON J. MAC LEOD J. W., 1926. — Inhibition of bacterial growth by some amino acids and its bearing on the use of tryptic digest as culture medium (*Journ. Path. and Bact.* XXIX, p. 13).

GRATH J. — Torrein di cultura par l'isolamenta e l'identiazion dette bacilli della difteriate (*Bull. Ist. Sieroter. Milanese*, t. X, 9).

GRANSPON A., 1923. — Selective culture medium for diphtheria bacillus (*Johns Hopkins Hosp. Bull.* 34-30).

HAMMERSCHMIDT G., 1924. — Ueber Gruppenbildung bei den Diphtheriebazillen (*Zentralbl. f. Bakt. Orig.* XCIII, 443).

HAMMERSCHMIDT G. — Deutsch. Med. Wochenschr. L. 1831.

HANAU A., 1914. — Ueber neuer Diphtherie Nährboden (*Zentralbl. f. Bakteriolog. Orig.* 72, 245).

HAVENS L. C., 1920. — Biologic studies of the diphtheria bacillus (*Journ. of Diseases*, XXVI, 388).

HAYWARD Y. A., 1894-5). — The cultivation of the diphtheria bacillus on hydrocele fluid with remarks on the examination of thirty cases (*Tr. Path. Soc. Lond.* 46, 291).

HIMMELWEIT FIED. 1932. — Erfahrungen mit der Blutwasser-Tellur wählplatte nach Clauberg (*Zentralbl. f. Bakt. Orig.* 126, p. 152).

HORGAN et MARSHALL, 1932. — A simple blood tellur medium for isolation of C. D. (*The Journ. of Hyg.* XXXVI, 554).

JONES L., 1932. — Studies of variability of corynebacterium Diphtherie. (*Proceed Society of. exp. bio. and Médic.* XXIX, 32, p. 1133).

JOHNSTON W., 1892. — A new method for the culture of diphtheria bacilli in hard-boiled eggs (*Med. News*, 61, 659).

KAIRIES, 1933. — Increase in number of investigation of B. D. and how they have been aided by use of Clauberg tellurium agar plate (*Med. Klin.*, n° 21, p. 709).

KAUTHACH et STEPHEN, 1896. — A new and easy method of preparing serum agar; an aid to the diagnosis of diphtheria (*Lancet*, 1835).

KLEBS, 1883. — Ueber Diphtherie (*Verhandl. Congr. innere Med. Woesb.*, 139).

KLEIN Karl, 1920. — Ein neuer Diphtherienährboden (*Deutsch. Méd. Wochenschr.*, 297, 11 mars 1920).

LEETE H. M., Mac LEOD Y. W. et MORISSON A. C., 1933. — Diphtherie in Hull, relation to bacteriological type (*Lancet*, CCXXV, p. 1141).

LENTZE F. A., 1933. — Eine wesentliche Verbesserung der Bakteriologischen Diphtherie-Diagnose (*Die Med. Welt.*, n° 6, 33, 188).

LEWIS E. S., 1933. — Routine bacteriologic diagnosis of diphtherie swols by means of Clauberg's blood tellurit medium (*Y. Lab. et Clin. Med.*, 18, 413).

LOEFFLER, 1887. — Die Ergebnisse weiterer Untersuchungen über die Diphtheribazillen (*Zentralbl. f. Bakt.*, 2, 105).

LORENTZ FR. H., 1932. — Neues zur Zuchtung der Diph. B. (*Zentralbl. of Bakt.*, LXXIV, 516).

LOWENTHAL, 1920. — Die bakteriologische Diphtheriediagnose (*Schweiz. Med. Wochenschr.*, 50, 1147).

LOBENAU, 1908. — Zur Säurebildung der Diphtheribazillen (*Arch. f. Hyg.*, 66, 305).

MANZINI C., 1931. — Sulle diagnosi batteriologica rapide della ditterite (*Gior. de bacteriol e immunol.*, 7, 17).

MARTIN L., 1898. — Production de la toxine diphthérique (*Ann. de l'Institut Pasteur*, 12-26).

MARTIN L., 1904. — Diagnostic bactériologique de la diph-

térie, bacilles pseudo-diphtériques (*Arch. Gén. de Méd.*, 2, 2644).

Mc CLUSE W. B., 1933. — Chocolate tellurite medium as aid in determining presence and virulence of bacilli diphteria of routin throist ovoies (*Cand. Reb. Health g.*, 24, p. 546).

Mc LEOD G. W., WEATHLEY B. et PHELON, 1929. — (*Brit. Journ. Exp. Path.*, VIII, 25).

MEGRAIL E., 1923. — (*Journ. of Infect. Diseases*, XXXIII, p 466).

MENTON J., 1932. — The differents forms of C. diphteriae (*Journ. of Path. and Bact.*, XXXV, p. 651).

MENTON, COOER, DUKE et FUSSEL, 1933. — Différents types of B. Diphteriae (*Journ. Hyg.*, XXXIII, p. 414).

MILENSKA-SYWOGNICHE. — Micro-méthode appliquée au diagnostic de la diphtérie (*C. R. Soc. de Biologie*, XCII, p. 1256).

MUCHA V., 1933. — Experiences with Clauberg medium (*Casep. lék. Casta*, 72, p. 400).

MUELLER J. H., KLISE K. S., PORTER E. F. et GRAYBIEL A., 1933. — Studies in cultural requirements of bacterie: diphteria bacillus (*Journ. of Bact.*, XXV, p. 609).

NOBLE W. C. (junior) et KIRACHE, 1928. — Action of B. diphteriae and some related organisms on glucosamine (*Journal Bact.*, XV, 55).

NUTTAL G. H. F. et GRAHAM SMITH G. S., 1908. — The bacteriology of diphterie (*Cambridge Reissue with supplementary, Bibliographie*, 1913).

ODELL R. HELLEN, 1918. — Comparison of Loeffler's coagulated blood serum and blood serum with the addition of sterile ox gall (*J. of Bact.*, 1918, p. 188).

PAI S. E., 1933. — A simple egg medium for the cultivation of B. D. (*The Chines Med. Journ.*, LXI, 33, p. 1203).

PARISH M. J., WHATLEY E. E. and O'BRIEN, 1932. — B. diphteriae, gravis and mitis (*Brit. Med Journ.* ii, 915).

PARKER H. B., 1928. — Rough and smooth strain of

corynebacterium diphtheriae on trypsin serum agar (*Brit. Journ. Exper. Path.*, t. IX, p. 207).

PERGOLA, 1918. — Contributo alla diagnosis batteriologica della difterite (*Ann. d'Ig.*, 28-101).

PERGOLA, 1922. — Il mio methodo di ricerca del bacillo difterico nella pratica dell'accertamento diagnostico della difterite (*Ann. d'Ig.*, 32, 669).

PERGOLA, 1923. — Modalita per oculare le diagnosi batteriologica della difterite (*L'Igien Moderne*, 16, 121).

PERGOLA, 1921. — La Riaca del bacillo difterio e la cultura di arricchimento (*Pathologica*, 13-113).

PERGOLA, 1929. — Substrati al tellurito e colorazione ridotta nella ricerca e dimostrazione del bacillo difterico (*Bull. d. Ist. sero therap. milanese*, 7, 1585).

PERGOLA, 1930. — Pour un plus grand emploi de la culture du B. D. en siero-novo-tellurite (S. U. T.) liquide, Soc. Intern. di Microbiol (*Bull. d. Ser. ital.*, 28, p. 249).

PERGOLA, 1931. — Agar ascite-tellurite (Clauberg) et sérum œuf-tellurite, Soc. Intern. di microb. (*Bull. d. Sez ital.*, 3, p. 627).

PERGOLA, 1932. — Procédés techniques pour accélérer et faciliter la recherche du bacille diphtérique dans les cultures en siero-novo-tellurite (S. U. T.) (*Soc. Intern. di microb. Bull. d. Suez. ital.*, 4, 23).

PIASECKA-ZEYLAND, 1933. — Diagnostic bactériologique de B. D. Valeur du milieu de Clauberg (*Annales de l'Institut Pasteur*, 50, p. 754).

POPE, 1911. — Zentralbl. f. Bakter., Orig., t. LXVIII, 475.

POPE et PINFIELDS, 1932. — Production of coccal forms of B. D. in media containing copper (*The Brit. Journ. of Exp. Path.*, XIII, 60).

POVITZ, EISHER, M. et JACKSON E, 1933. — Effectiveness of standard diphtheria-antitoxin against all types of diphtheria infection (*Journ. infect. Dis.* LII, p. 246).

QUENSEL, H, 1918. — En ny metod för färgning af difteribaciller (*Upsala läkaref förh*, 23, 384-6).

RANKIN, T. T., 1911. — A medium for bacillus diphtheriae potassium sulphocyanide neutral-red glucose serum (*J. of Hygiène* 11-271).

RANKIN, 1912. — Additional notes on the potassium sulphocyanide neutral red glucose serum medium (*J. of Hygiène* 12-60).

REVILI, V, 1932. — Ricerche sul corinebacteriae diphtheriae I method d'Isolement (*Gior. di Batteriol e Immunol.* V III-391).

REYE — Deut. Med. Woch 2-III-1554.

ROBINSON D, et MARSHALL, F, 1934. — Investigation on gravis, mitis and intermediaire types and their clinical signifi-
fiance (*The Journ of Path and Bact*, XXXVIII-73).

ROUX E. et YERSIN, 1888. — Contribution à l'étude de la diphthérie, 1^{re} série (*Annales de l'Institut Pasteur*, 2-629).

ROUX E. et YERSIN, 1889. — Contribution à l'étude de la diphthérie, 2^e série (*Annales de l'Institut Pasteur*, 3-273).

ROUX E. et YERSIN, 1890. — Contribution à l'étude de la diphthérie, 3^e série (*Annales de l'Institut Pasteur*, 4-385).

SCHARLAU B. 1932. — Zur Bacteriologischen diphtheriedia-
gnostik (*Zentralb für Bakt.* Orig 123 302).

SCHMITT P. 1933. — Verdient der neue claubersche den
Vorzhg vor dem Loefflerschen Diphtherienährboden ?
(*Deutsche med. Wochensch*, 59-924).

SCHOEN M 1930. — L'état actuel de nos connaissances sur
l'Amidon (*Bull. Soc. Chimie Biol.*, sept.-oct. 1930).

SCHÜRMANN W. et HAJOS, 1913. — Erfahrungen mit den
Tellurnährshboden beider bakteriologischen disphtheriedia-
gnore (*Zentralbl. f. Bakter* I Abt 57 Ref Beifreft 56 it).

SCHÜRMANN W. et HAJOS, 1915. — Die Bakteriologische
diphtheriediagnosc mit besonderer Berücksichtigung neuer
Forschungsergebnisse (*Deutsch. med. Wochensch*, 11-1158 *Hyg.*
Rundschau 25-729).

SCHWONER 1904. — Ueber die Hämolytische Wirkung des loefflerschen Bacillars (*Zentralbl. f. Bakt. I Abt.*, 35-608).

SIERAKOWSKI 1924. — Micro méthode pour le diagnostic de la diphtérie (*C. R. Soc. Biol.*, n° 8, p. 599).

SIESTROP J. C., 1930. — Ned. Tidjchr Vgenceska, LXXIV-9104.

SIMIC, T. V. 1931. — Das Auftreten und die Bedeutung von Bakteriamice bei diphterie (*Zentralbl. f. Bakt. O. I. C.* XX, 385).

SMITH J. F. 1914-15. — The isolation of *B. diphteriæ* by means of a simple medium containing potassium tellurate (*Journ. of path. and Bact.* X IX-12 2).

SMITH J. L., 1894. — A note on a new method of preparing culture media (*Brit. M. J.*, I, 1177).

SULDEY E. W., 1913. — Procédé simple de culture du bacille diphtérique pour servir au diagnostic bactériologique rapide (*Bull. Soc. Path. exot Paris*, 6-303).

TALLO, 1931. — Sulla diagnosi bactériologica della difterite (*Gior. batter.* 6-285).

TEMPÉ, 1930. — Culture du *B. D.* sur milieu au tellurite de potassium (*C. R. Soc. de Biologie*, 104, p. 1339).

Le diagnostic bactériologique rapide de la diphtérie (*ibidem*, 104, p. 1341).

THOMPSON, 1929. — Hydrolized serum agar for isolation of *B. D.* (*J. infect Dis*, 45-163).

TOMPAKOW Leo, 1914. — Ueber den wert der neuen conradi-schen Verfahren für die Diphteriediagnose (*Arch. of Hygien*, LXXXIII, p. 1).

VEDDER, 1933. — Comparison of Loeffler's and Clauberg's media for isolation of *B. D.* (*Neder tidschz v. geneesk*, 77, p. 2209).

WAHBY A. M., 1932. — A suggested medium for growth of *B. D.* (*Journal of, inf Dis*, 21 -32 441).

WAGNER C. 1913. — Erfahrungen mit der Conradi Trochs-

chen Tellurplatte zum diphtherienachweis (*München med. Wchnschr.*, 60-457).

WEIGMANN F. DEGNY J., 1932. — Die Branchbarkeit des Tellur. Blut glyzerin. agars nach Clauberg für die Bakteriologische Diphtherie diagnostik (*Zentralbl. f. Bakt. Origin.* 125. p. 374).

DE WOLFF, H. H., 1927. — Bio chemical properties of diphtheria and pseudodiphtheria bacilli (*Pharmaceutish Werkblat*, LX IV, 1226, 1263).

WOLFF et FERNBACH 1903. — Sur la coagulation de l'amidon. (C. R. Ac. Sc., 137-718).

WRIGHT H. A. and RANKIN A. L. K., 1932. — Biological types of diphtheria bicillus and clinical signification (*Lancet II*, 884).

WYON C. A., 1923. — Vitamins and bacterial growth (*Journ. of Path. and Bact.*, XXVI, p. 441).

1934. St-Amand (Cher). — Imprimerie CLERC (S. à R. L.)
